

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Avaliação da resposta anti-inflamatória de um extrato de
Vaccinium corymbosum (mirtilo) num modelo de Artrite
Reumatóide**

Mónica Ferreira Oliveira

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2012/2013

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Avaliação da resposta anti-inflamatória de um extrato de
Vaccinium corymbosum (mirtilo) num modelo de Artrite
Reumatóide**

Mónica Ferreira Oliveira

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Eduardo Figueira e
coorientada pela Professora Doutora Maria Rosário Bronze

2012/2013

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração e ao apoio de diversas pessoas quais gostaria de manifestar o meu profundo agradecimento.

À Professora Doutora Maria Eduardo Figueira, um agradecimento muito especial por toda a ajuda, compreensão, disponibilidade e paciência ao longo deste ano. Foi um privilégio tê-la como orientadora.

À Professora Doutora Maria Rosário Bronze, um agradecimento também muito especial pelo incansável acompanhamento, pela ajuda, disponibilidade e paciência durante o desenvolvimento do trabalho. Foi também um privilégio tê-la como coorientadora.

Ao Professor Doutor Luís Vilas Boas por todos os conhecimentos transmitidos e pelo apoio prestado durante as atividades práticas no laboratório do ITQB.

Ao ITQB por disponibilizar o seu laboratório para a realização do trabalho de caracterização química.

Ao laboratório de Nutracêuticos do IBET/ITQB pela colaboração na realização dos ensaios de avaliação da capacidade antioxidante, em especial à Doutora Catarina Duarte e a todas as pessoas envolvidas.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento através do projeto REDE/1518/REM/2005 do equipamento de LC-MS/MS localizado no Laboratório de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, que foi usado nos ensaios de caracterização química.

Ao laboratório de Farmacologia da Universidade de Lisboa, em especial ao Professor João Rocha e à Rosa Direito pela ajuda, disponibilidade e pelos ensinamentos transmitidos durante a realização dos ensaios *in vivo*.

À Senhora responsável pela realização das radiografias dos animais pela disponibilidade e cooperação.

À Marisa Freitas e Eduarda Fernandes do laboratório de toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela realização do ensaio da atividade antioxidante intracelular.

À Professora Doutora Matilde Castro coordenadora do primeiro ano deste mestrado e presidente da FFUL no segundo ano, pela assistência prestada.

À Elsa Mecha, Joana Antunes e Andreia Silva pela incansável disponibilidade, ajuda e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo destes meses. Muito obrigada pelo companheirismo e pela vossa amizade.

Em especial aos meus pais, porque sem eles não seria possível.

E a todos os outros que direta ou indiretamente me ajudaram e apoiaram durante estes dois anos.

Índice

Índice de figuras.....	11
Índice de tabelas.....	13
Abreviaturas e unidades.....	15
Resumo e palavras-chave.....	19
Abstract and Key Words.....	21
Introdução.....	23-68
1. Compostos fenólicos.....	23
1.1. Ácidos fenólicos.....	25
1.2. Flavonóides.....	26
1.2.1. Classificação dos flavonóides.....	26
1.2.2. Antocianinas.....	27
1.2.3. Flavanóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, isoflavonas e flavonóis.....	29
1.3. Estilbenos.....	31
1.4. Taninos.....	32
1.4.1. Taninos hidrolisáveis.....	32
1.4.2. Taninos condensados.....	32
1.5. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos.....	35
2. Radicais livres e o stress oxidativo.....	38
3. Antioxidantes e a sua atividade protetora.....	40
3.1. Atividade antioxidante dos compostos fenólicos.....	42
3.1.1. Efeitos pró-oxidantes dos compostos fenólicos.....	43
4. Técnicas utilizadas na caracterização dos compostos fenólicos.....	44
5. Mirtilo.....	46
5.1. Espécies e variedades de mirtilo.....	47
5.2. Morfologia do fruto.....	47
5.3. Produtos do mirtilo.....	48
5.4. Fatores indicadores da qualidade do mirtilo.....	48
5.5. Composição nutricional do mirtilo.....	49
5.6. Composição fenólica do mirtilo.....	50
5.7. Fatores que afetam a composição do mirtilo.....	51
5.8. Atividade biológica do mirtilo.....	52
6. Inflamação.....	57
6.1. Inflamação aguda.....	57
6.2. Inflamação crónica.....	59
6.3. Ação anti-inflamatória dos compostos fenólicos.....	60
7. Artrite reumatóide.....	61
7.1. Fisiopatologia.....	61
7.2. Fatores relacionados com a AR.....	65
7.3. Quando clínico e diagnóstico.....	66
7.4. Interação com outras patologias.....	67
7.5. Modelos animais de Artrite reumatóide (<i>in vivo</i>).....	68
Objetivos.....	69

Materiais e métodos.....	71-81
1. Materiais	
1.1. Ensaio de caracterização química.....	71
1.1.1. Amostras	
1.1.2. Reagentes e soluções	
1.1.3. Equipamentos	
1.2. Ensaio <i>in vivo</i>	71
1.2.1. Animais	
1.2.2. Reagentes e soluções	
1.2.3. Equipamentos	
2. Métodos	
2.1. Preparação dos extratos.....	72
2.1.1. Preparação das soluções extratantes	
2.1.2. Preparação do extrato de mirtilo rico em compostos fenólicos	
2.2. Determinação do teor de fenóis totais pelo método <i>Folin-Ciocalteu</i>	72
2.2.1. Preparação da solução padrão de ácido gálico	
2.2.2. Análise do teor de fenóis totais	
2.3. Determinação do teor de antocianinas totais.....	73
2.3.1. Preparação de soluções	
2.3.2. Análise do teor de antocianinas totais	
2.4. Determinação do teor de flavonóides totais.....	74
2.4.1. Preparação de soluções	
2.4.2. Análise do teor de flavonóides totais	
2.5. Determinação do teor de taninos hidrolisáveis.....	75
2.5.1. Preparação de soluções	
2.5.2. Análise do teor de taninos hidrolisáveis	
2.6. Determinação do teor de procianidinas totais.....	75
2.6.1. Preparação de soluções	
2.6.2. Análise do teor de procianidinas totais	
2.7. Caracterização da composição fenólica por cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detetor de díodos e eletroquímico (HPLC-DAD-ED)	
2.7.1. Análise cromatográfica.....	76
2.8. Caracterização de compostos fenólicos por cromatografia líquida associada a um detetor de espectroscopia de Massa (LC-ESI-MS/MS)	
2.8.1. Análise cromatográfica.....	77
2.9. Avaliação da atividade antioxidante	
2.9.1. Ensaio ORAC.....	77
2.9.2. Ensaio HORAC.....	78
2.9.3. Ensaio intracelular.....	78
2.9.3.1. Isolamentos de neutrófilos humanos	
2.9.3.2. Avaliação do <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos	
2.10. Ensaio <i>in vivo</i>	79
2.10.1. Ensaio edema da pata induzido por carragenina (inflamação aguda)	
2.10.1.1. Procedimento experimental.....	79

2.10.2. Ensaio artrite reumatóide induzida pelo colagénio-tipo II (inflamação crónica)	
2.10.2.1. Preparação da emulsão de colagénio-tipo II em adjuvante de Freund.....	80
2.10.2.2. Procedimento experimental.....	80
2.10.3. Cálculo do volume de extrato de mirtilo a administrar por animal.....	81
2.10.4. Expressão dos resultados e análise estatística.....	81
Resultados e discussão.....	83-111
1. Determinação das condições de extração.....	83
1.1. Determinação do teor em fenóis totais.....	83
1.2. Determinação do teor em antocianinas totais.....	84
1.3. Determinação do teor em flavonóides totais.....	86
1.4. Determinação do teor em taninos hidrolisáveis.....	87
1.5. Determinação do teor em procianidinas.....	88
1.6. Discussão das condições utilizadas para a preparação dos extratos.....	88
2. Caracterização dos compostos fenólicos no extrato de mirtilo a administrar aos animais...90	
3. Caracterização da composição fenólica no extrato por HPLC-DAD-ED e LC-ESI-MS/MS..91	
3.1.1. Identificação dos compostos fenólicos no extrato de mirtilo.....	92
3.1.2. Quantificação dos compostos fenólicos no extrato de mirtilo.....	100
3.1.3. Análise dos compostos com possível atividade eletroquímica	103
4. Avaliação da atividade antioxidante	
4.1.1. Ensaio ORAC e HORAC.....	105
4.1.2. Avaliação intracelular (oxidação de neutrófilos).....	107
5. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de mirtilo <i>in vivo</i>	
5.1. Modelo do edema da pata induzido por carragenina.....	107
5.2. Modelo de artrite reumatóide induzida pelo colagénio-tipo II.....	109
5.2.1. Edema da pata.....	109
5.2.2. Análises radiológicas.....	110
Conclusões.....	113
Referências bibliográficas.....	115
Anexos.....	153

Índice de figuras

- Figura 1** – Classificação dos compostos fenólicos nas diversas classes e subclasses
- Figura 2** – Estrutura básica dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos
- Figura 3** – Estrutura básica geral dos flavonóides
- Figura 4** – Estrutura básica das subclasses dos flavonóides
- Figura 5** – Estrutura geral das antocianidinas e a respetiva cor
- Figura 6** – Estrutura das antocianinas em diferente pH
- Figura 7** – Estrutura de alguns flavonóis mais comuns nos frutos
- Figura 8** – Estrutura das flavonas Apigenina e Luteolina
- Figura 9** – Estrutura das flavanonas mais comuns nas plantas
- Figura 10** – Estrutura das isoflavonas mais comuns nas plantas
- Figura 11** – Estrutura dos flavanóis mais comuns nas plantas
- Figura 12** – Estrutura básica dos estilbenos
- Figura 13** – Estrutura do ácido elágico (A) e do ácido gálico (B)
- Figura 14** – Reação de decomposição das proantocianidinas
- Figura 15** – Procianidinas diméricas do tipo A. Procianidina A2 (C4-C8 e C2-O7)
- Figura 16** – Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B
- Figura 17** – Estrutura das procianidinas triméricas (C1)
- Figura 18** – Esquema simplificado da biodisponibilidade dos flavonóides
- Figura 19** - Patologias causadas por espécies reativas de oxigénio e azoto
- Figura 20** – Classificação dos antioxidantes
- Figura 21** – Patogénese da AR nas articulações
- Figura 22** - Vias de inflamação e destruição da articulação na AR
- Figura 23** – Mecanismos das células e citocinas envolvidas na destruição da cartilagem na AR
- Figura 24** - Patogénese molecular dos doentes com artrite reumatóide ACPA-positiva
- Figura 25** – Alterações graves na articulação e osso provocadas pela evolução da AR
- Figura 26** - Avaliação do volume da pata no pletismómetro
- Figura 27** – Resultados obtidos nas diversas técnicas espectrofotométricas nos diferentes extratos
- Figura 28** - Perfis cromatográficos dos extratos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, diluídos 1:2, aos 280nm
- Figura 29** - Sobreposição dos cromatogramas das misturas de padrões 1, 2, 3 e 4 aos 280 nm
- Figura 30** - Sobreposição dos cromatogramas (HPLC-DAD-ED) a 280nm (a verde) e 254nm (a castanho), e o espectro de absorção UV do ácido gálico
- Figura 31** - Sobreposição dos cromatogramas (HPLC-DAD-ED) a 280nm (verde) e 320nm (azul), e o espectro de absorção UV do ácido clorogénico
- Figura 32** - Sobreposição dos cromatogramas (HPLC-DAD-ED) a 280nm (verde) e 360nm (vermelho), e o espectro de absorção UV da quercetina-3-glucósido
- Figura 33** - Sobreposição dos cromatogramas (HPLC-DAD) a 280nm (verde) e 527nm (rosa), e o espectro de absorção UV da peonidina-3-glucósido
- Figura 34** - Sobreposição dos cromatogramas em modo *Scan* (–) (varrimento entre m/z 50-1500) e DAD a 280 e 360 nm correspondentes à análise por LC-MS/MS do extrato de mirtilo para os animais
- Figura 35** - Espectro do pico ao t_r de 69,87 minutos que corresponde à peonidina-3-glucósido (ião molecular m/z 463)
- Figura 36** - Espectro de MS/MS do ião m/z 463
- Figura 37** – Cromatograma (LC-DAD-ESI-MS) aos 527nm (A) e o cromatograma obtido em modo *Scan* + (B)
- Figura 38** - Cromatograma obtido na análise do extrato 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com o detetor eletroquímico
- Figura 39** - Cromatograma obtido na análise do extrato administrado aos animais com o detetor eletroquímico
- Figura 40** – Inibição da oxidação dos neutrófilos pelo extrato de mirtilo em diferentes concentrações (0,6-18 $\mu\text{g/mL}$)
- Figura 41** - Efeito da administração oral do extrato de mirtilo e de outros fármacos comerciais no aumento do volume da pata 6 horas após a administração da carragenina
- Figura 42** - Percentagem de aumento do volume da pata em relação aos animais do grupo controlo
- Figura 43** – Radiografias da pata posterior esquerda do grupo controlo negativo (A), do grupo controlo positivo (B), do rato 1 do grupo mirtilo (C), e do rato 3 do grupo mirtilo (D)

Índice de tabelas

- Tabela 1** – Esqueleto básico das principais classes de compostos fenólicos
- Tabela 2** – Valor nutricional do mirtilo
- Tabela 3** – Conteúdo de alguns flavonóides presentes no mirtilo
- Tabela 4** – Derivados do ácido hidroxicinâmico presentes no mirtilo
- Tabela 5** – Efeitos benéficos na saúde dos compostos fenólicos presentes no mirtilo
- Tabela 6** – Resposta inflamatória e os respectivos mediadores químicos
- Tabela 7** – Solventes extratantes e tipo de tratamento utilizado nas amostras de mirtilo
- Tabela 8** - Gradiente de eluição dos solventes para separação de compostos fenólicos
- Tabela 9** - Programa de eluentes ao longo da análise no LC-ESI-MS/MS
- Tabela 10** – Grupos do ensaio *in vivo* e a sua caracterização
- Tabela 11** – Grupos do ensaio *in vivo* e a sua caracterização
- Tabela 12** - Teor total de fenóis nos extratos de mirtilo
- Tabela 13** - Teor de fenóis totais, obtidos por outros autores, nas diferentes espécies de mirtilos
- Tabela 14** - Teor total de antocianinas nos extratos de mirtilo
- Tabela 15** - Teores de antocianinas totais, obtidos por outros autores, nas diferentes espécies de mirtilos
- Tabela 16** - Teor total de flavonóides nos extratos de mirtilo
- Tabela 17** - Teores de flavonoides, obtidos por outros autores, nas diferentes espécies de mirtilos
- Tabela 18** - Teor de taninos hidrolisados nos extratos de mirtilo
- Tabela 19** - Teor de procianidinas nas amostras de mirtilo
- Tabela 20** – Resultados da caracterização em compostos fenólicos do extrato administrado aos animais
- Tabela 21** – Teores descritos na literatura para os extratos de mirtilo
- Tabela 22** – Correlação entre os teores de fenóis, flavonóides e antocianinas totais com as áreas totais dos cromatogramas a 280, 360 e 527 nm, respetivamente.
- Tabela 23** – Composição das misturas de padrões e os respetivos tempos de retenção (t_r)
- Tabela 24** – Compostos presentes no extrato de mirtilos, identificados por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS
- Tabela 25** – Concentração dos compostos identificados e alguns dos teores descritos na literatura.
- Tabela 26** - Fator de correção do peso molecular (FCPM) para a quantificação individual das antocianinas
- Tabela 27** – Teores das antocianinas identificadas e alguns dos valores descritos na literatura
- Tabela 28** – Teores de ORAC e HORAC obtidos nos extratos
- Tabela 29** – Teores de ORAC e HORAC para diversos frutos vermelhos
- Tabela 30** – Correlação entre o teor de fenóis, flavonóides e antocianinas totais e a atividade antioxidante do extrato

Abreviaturas

4CL – 4 cumarato Coenzima A ligase
5-LOX - 5-lipoxigenase
AA - ácido araquidónico
AACP – Anticorpo anti proteína citrulinada
AC – Ácido cafeico
ACC – Acetil - Coenzima A carboxilase
ADAMTS – Desintegrina e metaloproteinase com *Thrombospondin Motifs*
ADN – Ácido desoxirribonucleico
AGEs – Produtos finais da glicosilação
AIC II – Artrite induzida por colagénio tipo II
AINES – Anti-inflamatório não esteroides
ALEs – Produtos finais da oxidação lipídica
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA – Análise da variância
ANS - Antocianidina sintase (leucoantocianidina dioxigenase)
AP-1 - ativador de proteína-1
AR – Artrite reumatóide
ATP – Adenosina trifosfato
AUS - Aureusidina sintase
BHA - Hidroxianisol butilado
BHT – Hidroxitolueno butilado
C4H - Cinamato 4-hidroxilase
CAT – Catalase
CHI - Chalcona isomerase
CHS - Chalcona sintase
CoA – Coenzima A
COX – Cicloxigenases
CP – Péptido citulado
CREB - Proteína auxiliar da ligação proteínas - cAMP
DAD – Detetor de díodos
DFR – Dihidroflavonol 4-redutase
DIC – Dissociação induzida por colisão
DMARDs – Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença
DP – Desvio padrão
EC – Epicatequina
ECG – Epicatequina-3-galhato
ED – Detetor eletroquímico
EGC – Epigallocatequina
EGCG – Epigallocatequina-3-galhato
ES - Espécies eletrofílicas
ESI – Ionização por eletrospray
F3GT - UDP-Glicose:antocianidina 3-O-glucosiltransferase
F3H - Flavanona 3b-hidroxilase
FCPM – Fator de correção do peso molecular
FD – Fator de diluição
FLS - Flavonol sintase
FNR - Flavanona 4-redutase
FNSI - Flavona sintase I
FNSII - Flavona sintase II
GAE – Ácido gálico
GLUTs – Transportadores de glucose
GM-CSF – Fator estimulante de colónias de granulócitos-monócitos

GP – Gaiato de propilo
 GPX – Glutathione peroxidase
 GSH – Glutathione redutase
 GSH-Px – Catalase e glutathione peroxidase
 HAT – Transferência de átomos de hidrogénio
 HETES – Ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos
 HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
 HLA – Antígeno leucocitário humano
 HORAC – Capacidade antioxidante do radical hidroxilo
 HPETES – Ácidos hidroperoxi-eicosatetraenoicos
 HPLC – Cromatografia líquida a alta pressão
 ICAM – Molécula de adesão intracelular
 IFN γ – Interferon γ
 Ig – Imunoglobulina
 IL – Interleucina
 iNOS – Óxido nítrico sintetase induzível
 I κ B – Subunidade inibitória do NF κ B
 IKK – I κ B cinase
 LDL – Lipoproteína de baixa densidade
 LH – Lípidos
 LOX – Lipoxigenases
 LPH – Lactase florizina hidrólase
 LPO – Lipoperoxidação
 LT – Leucotrieno
 M-CSF – Fator estimulador das colónias de macrófagos
 MAPK – Proteinocinase ativada por mitógenos
 MCP – Articulações metacarpofalângicas
 MCP – Proteína atratora de macrófagos
 MDA – Malondialdeído
 MHC – Complexo de maior histocompatibilidade
 MIP – Proteína macrófaga inflamatória
 MMP – Metaloproteinases
 MPO – Mieloperoxidase
 MRP – Proteína resistente a multidrogas (transportador membranar)
 MS – Espectroscopia de massa
 MTP – Articulações metatarsofalângicas
 NADPH – Nicotinamida adenina difosfato
 NF κ B – Fator nuclear κ B
 NO – Óxido nítrico
 ORAC – Capacidade de absorção do radical oxigénio
 PAL – Fenilalanina amónia liase
 PCR – Reação em cadeia da polimerase
 PGs – Prostaglandinas
 PI-3K – Fosfoinosítido 3-quinase
 PIP – Articulações interfalângicas proximais
 PK – Proteinocinases
 PKR – Policétido redutase
 PLA2 – Fosfolipase A2
 PPG – Propilgalato
 PTPN22 – Proteína tirosina fosfatase, não recetor 22 (codifica genes)
 RANK – Recetor ativador do fator nuclear κ B
 RANKL – Recetor ativador do fator nuclear κ B ligante
 RAS – Espécies reativas de azoto
 RF – Fator reumatóide

RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SET – Transferência de elétrons
SGTLs – Transportadores de glucose dependentes de sódio
SOD – Superóxido dismutase
STS – Estilbeno sintase
TBHQ – Butilhidroquinona terciária
TBX – Tromboxanos
TCR – Recetor das células T
TEAC – Equivalentes de Trolox
TGF β – Fator transformador de crescimento β
TH – Células T *helper*
THS – Terapia de substituição hormonal
TNF α – Fator de necrose tumoral α
TNF α R – Recetor de TNF- α
TR – Tempo de retenção
UDP – Uridina difosfato
UV – Radiação ultravioleta
VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular
VHS – Velocidade de hemossedimentação
 λ máx – Comprimento de onda de absorção máxima

Unidades

°C – Grau Celsius
CAEAC – Equivalentes do ácido cafeico
Cm – Centímetro
Da – Dalton
EAT – Equivalentes de α -tocoferol
eV – Eletrovolt
g – Grama
Hz – Hertz
Kcal – Quilocaloria
kg – Quilograma
kV – Kilovolt
L – Litro
M – Molar
mg – Miligrama
min - Minuto
mL – Mililitro
mol – Número de moles
nm – Nanómetro
 μ g – Micrograma
 μ l – Microlitro
ppm – Parte por milhão (mg/L)
rpm- rotações por minuto
UI – Unidades internacionais
V – Volt
 Ω - ohm

Resumo

Os mirtilos pertencem ao grupo dos frutos vermelhos, vulgarmente conhecidos pelos seus efeitos benéficos na saúde, principalmente devido ao elevado teor de compostos fenólicos. Estes compostos já foram amplamente estudados e está comprovada que a sua ação está relacionada com a atividade antioxidante e anti-inflamatória, entre muitas outras. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato de mirtilos num modelo animal de artrite reumatóide e para tal preparou-se um extrato recorrendo à variedade *Southern Highbush*, da espécie *Vaccinium corymbosum*. Inicialmente testaram-se vários solventes extratantes e diferentes modos de preparação da amostra, com o intuito de determinar qual a melhor metodologia de extração para estes compostos. O extrato resultante da extração com etanol:água 60% e trituração com azoto líquido apresentou o maior teor em fenóis totais. Como tal para a preparação do extrato que foi administrado aos animais utilizou-se este procedimento e procedeu-se à caracterização dos compostos fenólicos presentes no extrato, por ensaios espectrofotométricos (determinação de fenóis, antocianinas, flavonóides, taninos hidrolisáveis e procianidinas totais) e ensaios cromatográficos (HPLC-DAD-ED e LC-DAD-ESI-MS/MS). A atividade antioxidante foi avaliada por ensaios químicos ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity) e intracelulares, tendo-se obtido valores de 2286,9 μmol de equivalentes de Trolox/100 gramas e 599,8 μmol de equivalentes de ácido cafeico/100 gramas para as primeiras duas técnicas respetivamente. Na avaliação da capacidade antioxidante intracelular verificou-se que para o extrato com uma concentração de 18 $\mu\text{g/ml}$ (concentração mais alta estudada) a inibição da oxidação do luminol foi aproximadamente de 90%. À exceção da concentração mais baixa (0,6 $\mu\text{g/ml}$), todas as outras concentrações testadas protegeram de forma significativa o luminol da oxidação. Para o estudo da inflamação aguda, num modelo de edema da pata induzido pela carragenina, administrou-se uma dose única do extrato de mirtilos (12,5 mg de fenóis totais/kg de rato), por via oral. Após análise estatística dos resultados relativos à percentagem de aumento do volume da pata, pelo teste ANOVA e de *Bonferroni*, concluiu-se que a administração oral do extrato de mirtilos induziu em 30% a inibição da inflamação, comparativamente com a carragenina. No ensaio da inflamação crónica com a duração de 35 dias, num modelo de artrite reumatóide (AR) induzida por colagénio tipo II (CII), administrou-se por via oral o extrato com a mesma concentração do ensaio anterior. A redução do edema nas patas dos animais tratados foi cerca de 70%, e a maioria dos animais não apresentava edema visível no fim do ensaio. A análise radiográfica das patas destes animais revelou que tanto as articulações como o osso não apresentavam erosão nem lesões significativas comparativamente com o grupo de controlo positivo, o que sugere que o extrato de mirtilo induz a diminuição tanto do edema como das lesões articulares, evitando a progressão da inflamação e, consequentemente, diminuindo os seus sinais.

Palavras-chave: mirtilos, compostos fenólicos, antioxidante, anti-inflamatório, inflamação, edema, artrite reumatóide

Abstract

Blueberries belong to the group of red fruits, commonly known for their beneficial effects on health, mainly due to the high content of phenolic compounds. These compounds have been widely studied and are proven that its action is related to the antioxidant and anti-inflammatory, among many others. The main objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory activity of the extract of blueberries in an animal model of rheumatoid arthritis and for that a extract was prepared using the Southern Highbush variety, from the species *Vaccinium corymbosum*. Initially was tested various extractants solvents and different modes of sample preparation, in order to determine the best extraction methodology for these compounds. The extract resulting from the extraction with ethanol: 60% water and grinding with liquid nitrogen showed the highest content of total phenols. For the preparation of the extract that was administered to the animals, was used the above procedure and next proceeded to the characterization of the phenolic compounds present in the extracts by spectrophotometric tests (determination of phenols, anthocyanins, flavanoids, tannins and hydrolysable total procyanidins) and tests chromatographic (HPLC-DAD-ED and LC-DAD-ESI-MS/MS). The antioxidant activity was assessed by chemical assays ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity) and intracellular yielding values of 2286.9 equivalents Trolox/100 grams and 599.8 equivalent caffeic acid/100 grams for the first two techniques respectively. In the assessment of intracellular antioxidant capacity, was verified that for an extract with a concentration of 18 mg/ml (the highest concentration studied) the inhibiting oxidation of luminol was approximately 90%. Except for the lowest concentration (0.6 mg/ml), all other concentrations tested protected the luminol oxidation. For the study of acute inflammation in the paw edema induced by carrageenan model, was administered a single dose of blueberry extract (total phenols 12.5 mg/kg of mouse) orally. After statistical analysis of the results on the percentage increase of paw volume by ANOVA and Bonferroni's test, it was found that oral administration of the extract of blueberry induce 30% inhibition of inflammation as compared with carrageenan. In the test of chronic inflammation lasting 35 days in a model of rheumatoid arthritis (RA) induced by collagen type II (CII) administered orally with the same concentration of the above test. The reduction of edema in the paws of the treated animals was about 70%, and most animals had no visible swelling at end of study. Radiographic examination of the paws revealed that both joints and bone erosion showed no significant lesions compared with the positive control group, suggesting that the blueberry extract induces the decrease of the lump and joint damage, avoiding the progression of the inflammation and decreasing their signals.

Key words: blueberry, phenolic compounds, antioxidant, anti-inflammatory, inflammation, lump, rheumatoid arthritis.

Introdução

A utilização de frutos e legumes na dieta tem vindo a aumentar nos últimos anos, devido à valorização do seu valor nutritivo, pelo seu valor calórico reduzido e pelos seus efeitos benéficos na prevenção de doenças e no bem-estar e saúde. Desde há muito que se sabe haver uma correlação positiva entre a ingestão de frutos e legumes e a prevenção de doenças crónicas. Estudos recentes relacionam a ingestão de frutas que tenham propriedades antioxidantes com a redução do risco do desenvolvimento de algumas doenças crónico-degenerativas (Wicklund et al., 2005). Os frutos e vegetais são ricos em minerais e vitaminas e também bons fornecedores de antioxidantes, incluindo o ácido L-ascórbico, tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos (Wolfe et al., 2003). As substâncias antioxidantes têm a capacidade de inibir o processo oxidativo, pela redução da quantidade de radicais livres no organismo (Pieniz et al., 2009) e parecem ser das principais responsáveis pela diminuição de alguns dos fatores de risco, como o stresse oxidativo e a inflamação, que estão envolvidos no desenvolvimento de algumas doenças crónicas.

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre pela ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de eletrões decorrentes do metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, a concentração desses radicais no organismo pode tornar-se elevada, devido a uma maior produção intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidativos naturais. Perante estes fenómenos, os radicais livres podem passar a pró-oxidantes. O desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, que resulta na indução de danos celulares por ação dos radicais livres, tem sido denominado *stresse oxidativo* (Tavares et al., 2000; Barreiros et al., 2006). A defesa contra o stresse oxidativo é realizada por compostos com ação antioxidante, presentes nos alimentos, e pelas enzimas catalase (CAT), glutathione redutase (GSH), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) (Tavares et al., 2000; Barreiros et al., 2006). Muitas vezes para equilibrar a balança dos radicais livres formados e a ação das enzimas endógenas é necessário o envolvimento de antioxidantes exógenos que são veiculados pela dieta.

Os antioxidantes apresentam-se como alternativa para prevenir a oxidação *in vivo* e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos (Pieniz et al., 2009).

Existem alimentos dotados da capacidade de sequestrar radicais livres (Cevallos-Casals et al., 2003). Estudos comprovam a existência de uma relação inversa entre a ingestão diária de alimentos ricos em antioxidantes e a incidência de doenças no Homem, o que reforça a importância de suplementos antioxidantes (Krishnaiah et al., 2010). Assim, uma dieta composta por alimentos ricos em compostos antioxidantes pode ser uma mais valia no controlo de fatores de risco e, consequentemente, no desenvolvimento precoce de algumas doenças crónicas.

Dentro dos alimentos ricos em antioxidantes temos os vegetais e frutos, nomeadamente os frutos vermelhos como morangos, mirtilos, framboesas, amoras e outros que, para além de conterem vitaminas antioxidantes têm níveis elevados de compostos fenólicos (Wolfe et al., 2008).

1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos fazem parte de um grupo amplo de fitoquímicos que resultam do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento, reprodução e pigmentação. São responsáveis pela proteção da planta e por isso são sintetizados em condições de *stress oxidativo* como ferimentos, infeções por microrganismos, carência hídrica, exposição a níveis elevados de radiação ultravioleta, e ataques de organismos patogénicos ou herbívoros (Alvarez-Jubete et al., 2010; Ângelo e Jorge, 2007; Iwashina, 2003; Shahidi e Naczk, 2004). Estes compostos conferem cor, sabor, adstringência e estabilidade oxidativa (Ângelo e Jorge, 2007; Shahidi e Naczk, 2004). E são considerados compostos bioativos não nutrientes, o que os torna uma parte importante da dieta (Carlsen et al., 2003).

Na natureza estes compostos encontram-se na forma livre mas maioritariamente estão ligados a açúcares (glicosídeos), aumentando a sua solubilidade, ou a proteínas (Ângelo e Jorge, 2007).

Encontram-se distribuídos de forma não uniforme nas plantas, os compostos insolúveis encontram-se nas paredes celulares, enquanto os solúveis são encontrados nos vacúolos (Nacz e Shahidi, 2006). Muitos desses compostos possuem atividades biológicas importantíssimas em mamíferos mas podem apresentar efeitos tóxicos quando ingeridos em altas doses (Cardoso et al., 2009).

Os compostos fenólicos incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, derivadas da fenilalanina e da tirosina. A sua estrutura molecular básica é constituída, pelo menos, por um anel aromático no qual se ligam um ou mais grupos hidroxilo (OH) (Nacz e Shahidi, 2006).

Os milhares de compostos fenólicos podem ser agrupados em diferentes classes (figura 1), de acordo com a sua estrutura química básica (tais como o tipo e o número de anéis aromáticos), e em diferentes subclasses, de acordo com substituições específicas na estrutura básica, a associação com açúcares e formas de polimerização (Manach et al., 2004). Genericamente podem ser divididos em dois grandes grupos: os flavonóides, subdivididos em flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonas; e os não flavonóides, que compreendem os grupos dos ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos ou ácidos hidroxicinâmicos), taninos, cumarinas e estilbenos (Fraga et al., 2009; Li et al., 2009).

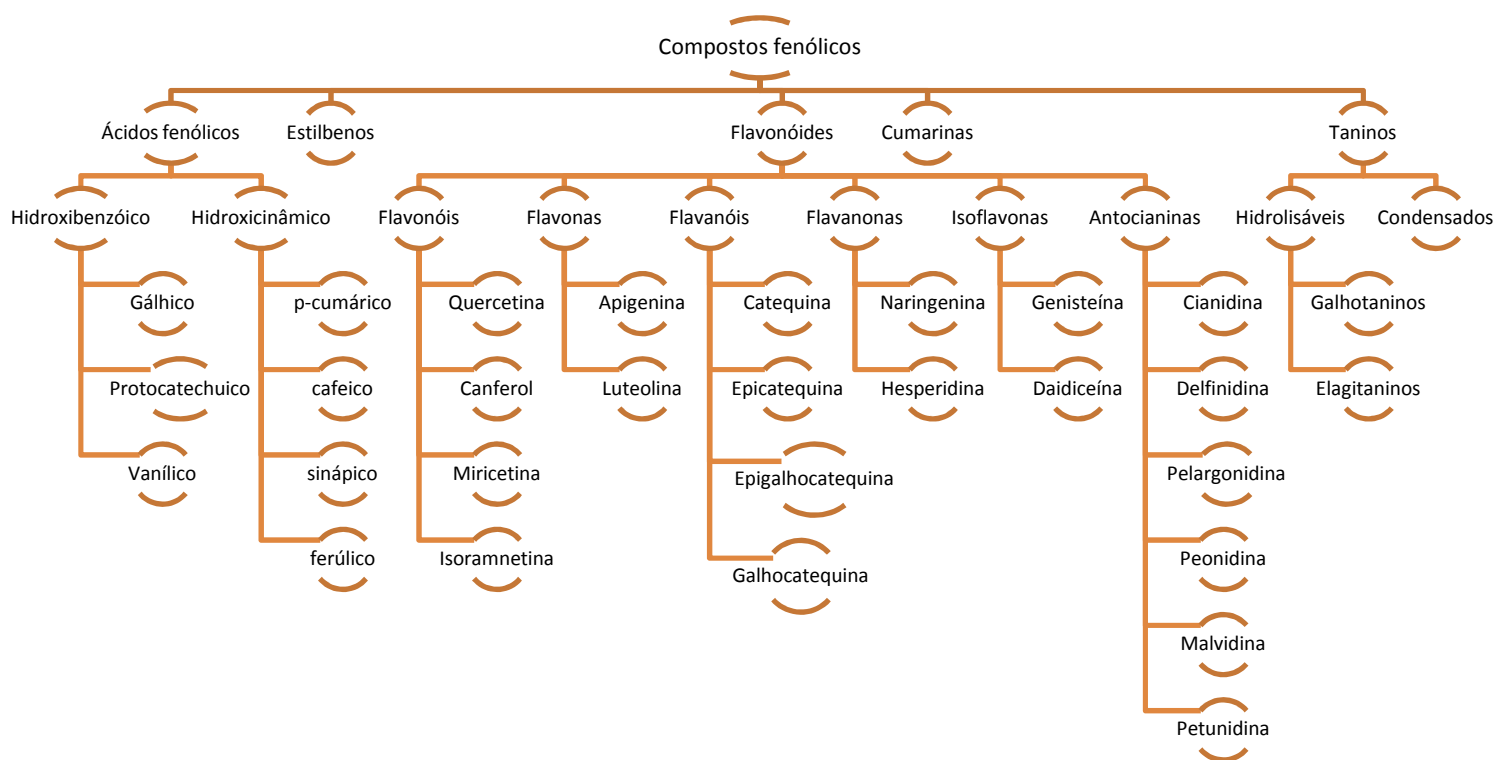


Figura 1 – Classificação dos compostos fenólicos nas diversas classes e subclasses (alguns exemplos)

Os polifenóis são distribuídos pelas diferentes classes de acordo com o seu esqueleto de átomos de carbono (tabela 1): C6, fenóis simples como o resorcinol; C6-C1, ácidos fenólicos como o ácido gálhico; C6-C3, ácidos hidroxicinâmicos como o ácido cafeico; C6-C4, hidroxiantraquinonas; C6-C2-C6, estilbenos como o resveratrol; C6-C3-C6, flavonóides como a quercetina; (C6-C3)2, linhanas; (C6-C3-C6)2, biflavonóides; (C6-C3)n, lenhinas; (C6-C3-C6)n, taninos condensados ou proantocianidinas (Apak et al., 2007; Fraga et al., 2009). Nestas classes há grandes variações estruturais, dependendo do nível de hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfonação das moléculas.

Tabela 1 – Esqueleto básico das principais classes de compostos fenólicos (*adaptado* Ferguson, 2001)

Classe	Esqueleto básico	Exemplos de fontes
Ácidos hidroxibenzóicos	C6-C1	Plantas superiores e fetos
Ácidos hidroxicinâmicos	C6-C3	Plantas superiores; constituinte da parede celular
Cumarinas	C6-C3	Morangos, cerejas, castanha da Índia
Isocumarinas		
Estilbenos	C6-C2-C6	Casca de uvas
Flavonóides	C6-C3-C6	Difundidos em todo o reino vegetal
Taninos hidrolisáveis	(C6-C1) _n	Uvas, framboesas, morangos
Taninos condensados	(C6-C3-C6) _n	Uvas, mirtilos, amoras, groselhas
Lignanais	(C6-C3) ₂	Sementes de linhaça
Ligninas	(C6-C3) _n	Constituintes da parede celular de diversas plantas – fibra dietética

1.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos dividem-se em três classes, definidas segundo a sua estrutura: os derivados do ácido hidroxibenzóico, os derivados do ácido hidroxicinâmico e as cumarinas ou derivados do ácido *o*-cumárico (Ramalho e Jorge, 2006; Estevinho et al., 2008).

Na figura 2 apresentam-se as estruturas básicas dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos e alguns exemplos de ácidos de cada uma das classes.

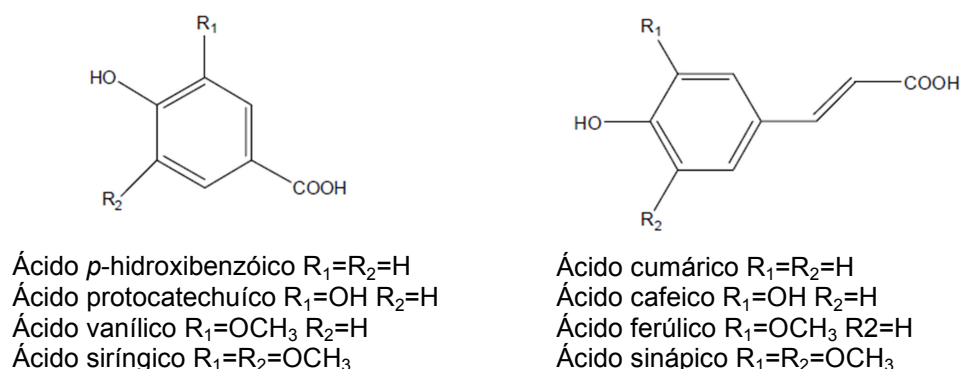


Figura 2 – Estrutura básica dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos

Nos derivados dos ácidos hidroxibenzóicos estão incluídos os ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatechuico, elágico, vanílico, siríngico, gálhico, etc., e ésteres, nomeadamente dos ácidos salicílico e hexahidroxidifenico. A maioria destes compostos são biossintetizados através da via do ácido chiquímico, a partir do 3-desidrochiquimato, ou da degradação da cadeia lateral de ácidos hidroxicinâmicos através de uma série de reações análogas à β -oxidação dos ácidos gordos. Os ácidos hidroxibenzóicos com grupos di-hidroxilo na posição *meta* são derivados da via do acetato (Belitz e Grosch, 2009; Robbins, 2003; Volp et al., 2008).

Os ácidos hidroxicinâmicos são biossintetizados a partir da fenilalanina, sendo que os mais comuns são os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico, e ésteres, nomeadamente dos ácidos quínico, chiquímico e tartárico. Estes ácidos podem estar ligados a açúcares, nomeadamente o ácido cafeico-4-O-glucósido, o ácido *p*-cumárico-O-glucósido e o ácido ferúlico-O-glucósido. Podem também ser encontrados alguns derivados do ácido hidroxicinâmico ligados ao ácido quínico, exemplo disso são os ácidos cafeolquínicos e os ácidos *p*-cumaroilquínicos (Belitz e Grosch, 2009; Volp et al., 2008).

1.2. Flavonóides

Os flavonóides são uma classe de moléculas de baixo peso molecular, com estrutura base C6-C3-C6, e de acordo com a figura 3 é constituída por dois anéis benzénicos (A e B) ligados através de um anel pirano (C). Estes compostos encontram-se em grande quantidade nas folhas, sementes, flores e frutos tendo já sido identificados mais de 4000 flavonóides (Heim et al., 2002).

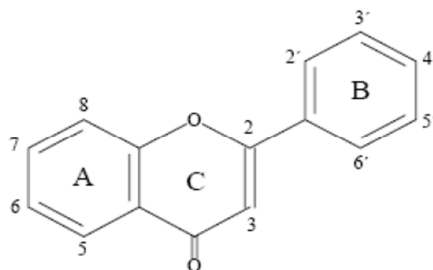


Figura 3 – Estrutura básica geral dos flavonóides

Os flavonóides são metabolitos secundários produzidos pelas plantas para proteção contra os efeitos da radiação ultravioleta, herbívoros e agentes patogénicos, devido às suas propriedades fungicidas e bactericidas (Heim et al., 2002). Desempenham um papel importante na biologia vegetal, respondem à luz e controlam os níveis de auxinas reguladoras do crescimento e diferenciação das plantas, são importante na fixação de metais como o ferro e o cobre e conferem coloração às plantas podendo, desta forma, contribuir para os fenómenos de polinização (Martínez-Flórez et al., 2002).

Os flavonóides não são sintetizados no organismo humano tendo, por isso, obrigatoriamente que ser obtidos pela dieta, através da ingestão de alimentos de origem vegetal que os contenham, ou de suplementos alimentares (Cao et al., 1997). A preparação dos alimentos para consumo pode, algumas vezes, resultar em perdas destes compostos, em maior ou menor grau, variando de acordo com o tipo de alimento e o tipo de preparo empregue. Contudo, os flavonóides são compostos relativamente estáveis, pois resistem à oxidação, altas temperaturas e moderadas variações de acidez (Ross e Kasume, 2002; Machado et al., 2008).

Embora os hábitos alimentares das populações sejam muito diversificados, estima-se que o valor médio de ingestão de flavonóides se situe entre os 20 e os 26 mg/dia sendo predominantes os flavonóis, especialmente derivados da quercetina. Desta forma, os níveis de ingestão de flavonóides excedem o de outros antioxidantes como o β -caroteno (2 a 3 mg/dia) ou a vitamina E (7 a 10 mg/dia), mas é inferior à vitamina C (70 a 100 mg/dia). Desta forma, os flavonóides representam uma importante contribuição para o potencial antioxidante da dieta humana (Martínez-Flórez et al., 2002).

1.2.1. Classificação dos flavonóides

Os flavonóides podem, de acordo com a sua estrutura, ser divididos em subclasses (figura 4) que incluem as flavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (Ferreira e Abreu, 2007; Fraga et al., 2009), tal como já foi referido acima. As classes de flavonóides são diferenciadas entre si devido ao nível de oxidação e ao padrão da substituição do anel C; dentro de cada uma das classes, os compostos diferem entre si devido ao padrão de substituição dos anéis A e B (Fraga et al., 2009; Pietta, 2000).

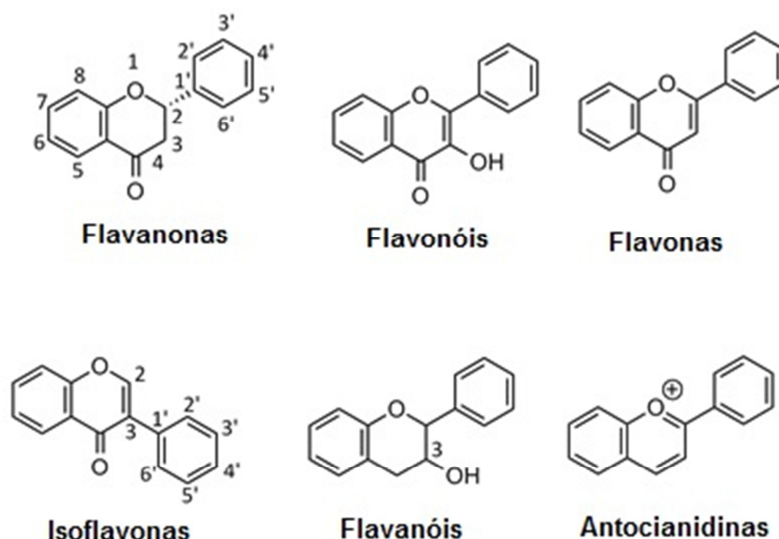


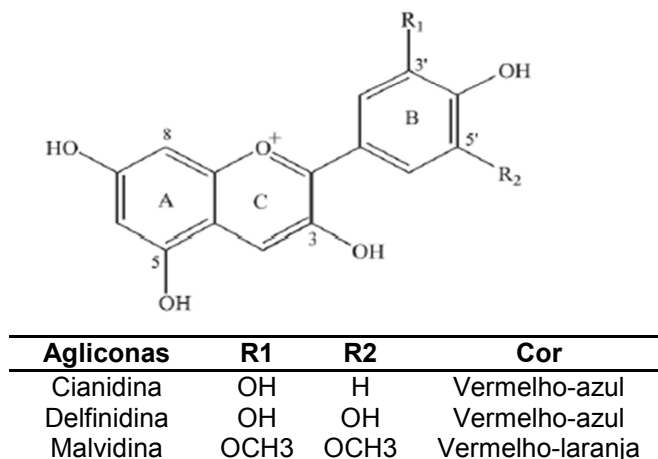
Figura 4 – Estrutura básica das subclasses dos flavonóides (*adaptado* de Martínez-Flórez et al., 2002)

Os glicosídeos são formados por flavonóides ligados a resíduos de açúcares. A configuração mais frequente é constituída por uma molécula de D-glucose unida com a cadeia principal flavonóide nas posições 3 ou 7, mas também é possível encontrar estes compostos associados a outros açúcares, como a D-galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose ou o ácido D-glucorónico (Rice-Evans et al., 1996; Narayana et al., 2001; Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006).

1.2.2. Antocianinas

O nome “antocianinas” deriva do grego *anthos*, flor e *kyanos*, azul, e foi criada por Marquart em 1835 para designar os pigmentos azuis das flores (Lima e Guerra, 2003; Manhita et al., 2006). São um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis (Degáspari e Waszcynskyj, 2004), glucósidos das antocianidinas (aglicona), e um dos subgrupos dos flavonóides. São pigmentos naturais, responsáveis por uma variedade de cores atrativas de bagas, frutos, flores e folhas, que incluem o azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho (Abe et al., 2007; Cisse et al., 2009; Cooper-Driver, 2001; Silveira et al., 2007). Estão presentes em variadíssimos alimentos, por exemplo nas cerejas, uvas, amoras, framboesas, mirtilos, morangos e em alguns chás. Após a sua síntese, as antocianinas são armazenadas em meio aquoso, nos vacúolos celulares (Brouillard et al., 2010).

São conhecidas aproximadamente 22 agliconas, das quais 18 ocorrem naturalmente, mas apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) têm relevância nos alimentos (figura 5) (Cooper-Driver, 2001; Fraga et al., 2009; Francis et al., 2000; Scalbert e Williansom, 2000; Zhang et al. 2004). Os glucósidos derivados das três antocianidinas não-metiladas (cianidina, delphinidina e pelargonidina) são os mais comuns (Castañeda-Ovando et al., 2009).



		Pelargonidina	H	H	Laranja
		Peonidina	OCH3	H	Vermelho-azul
		Petunidina	OCH3	OH	Vermelho-azul

Acilação (esterificação dos açúcares)		Substituição glicosídica (posições 3 e 5)
Ácidos cinâmicos	Ácidos alifáticos	D-glucose
p-cumárico	acético	D-galactose
ferúlico	sucínico	D-xilose
cafeico	malónico	L-ramnose
		L-arabinose
		Rutinese
		Sambubiose

Figura 5 – Estrutura geral das antocianidinas e a respetiva cor (*adaptado* de Malacrida e Motta, 2006; Kong et al., 2003)

Diferem entre si pelo número e posição de grupos hidroxilo e o seu grau de metilação; pelo número, natureza, tipo e posição dos açúcares (Clifford, 2000; He e Giusti, 2010) ligados à molécula, e pelo número e natureza dos ácidos orgânicos ligados como os ácidos alifáticos (malónico, málico, sucínico, oxálico, acético, sináptico) ou aromáticos (*p*-cumárico, cafeico, ferúlico, gálhico, *p*-hidroxibenzóico) (Kong et al., 2003; Mazza et al., 1987).

Raramente são encontradas antocianidinas livres nas plantas, ocorrendo comumente glicosiladas com açúcares que aumenta a estabilidade e a solubilidade das moléculas (Francis, 2000). A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3. O segundo açúcar quando presente na molécula encontra-se na posição 5, porém podem ocorrer glicosilações nas posições 7, 3, 4 e 5 (Malacrida e Motta, 2006). É importante salientar que as antocianinas naturais nunca apresentam os grupos hidroxilos nas posições 5, 7 e 4 substituídas ao mesmo tempo. Um dos grupos hidroxilo deve permanecer livre numa dessas posições para a formação da estrutura quinoidal, responsável pela cor (Bridle e Timberlake, 1997). A glucose, ramnose, xilose, galactose, arabinose são os açúcares mais comumente ligados às antocianidinas, ocorrendo como monoglicósidos. A rutinese (glucose e ramnose), soforose (glucose e glucose), sambubiose (glucose e xilose), gentiobiose (glucose e glucose) e frutose também podem ocorrer e são diglicósidos e triglicósidos glicosilados diretamente na aglicona (Clifford et al., 2000; Skrede et al., 2002; Zhao, 2007). A acilação das antocianinas reduz a sua solubilidade em água mas aumenta a sua estabilidade (Bassa et al., 1987; Fossen et al., 1998; Giusti e Wrolstad, 2003).

De acordo com Giusti e Wrolstad (2001), as antocianinas são muito instáveis e suscetíveis à degradação. A estabilidade é afetada principalmente pelos seguintes fatores: estrutura química, pH, temperatura, luz ultravioleta e visível, ou outras fontes de radiação ionizante, presença de oxigénio, presença de enzimas e interações entre os componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, iões metálicos, açúcares e co pigmentos (Malacrida e Motta, 2006; Provenzi et al., 2006).

Relativamente à coloração das antocianinas, o número de grupos hidroxilo, metoxilo e glucósido presentes na estrutura influenciam a cor das mesmas. Quanto maior o número de grupos hidroxilos e glucósidos, mais azul é a cor, e quanto maior o número de grupos metoxilos, mais intensa é a cor vermelha. Os grupos hidroxilo ligados ao C₃, particularmente, causam mudanças de coloração do amarelo-alaranjado para o vermelho (Mazza et al., 1987).

Um dos mais importantes fatores que afetam a coloração das antocianinas é o pH. As antocianinas mudam a sua estrutura conforme a mudança de pH do meio, podendo assim, possuir diferentes colorações. Assim, podem ser utilizadas como um indicador natural de pH. Na figura 6, encontram-se as formas estruturais predominantes das antocianinas em pH 1,0, 4,5 e 7,0. Nesta figura observa-se que a forma oxónio (que vai do laranja ao roxo) predomina a pH 1,0 e a forma hemiacetal (incolor) a pH 4,5 (Giusti e Wrolstad, 2001; Malacrida e Motta, 2006).

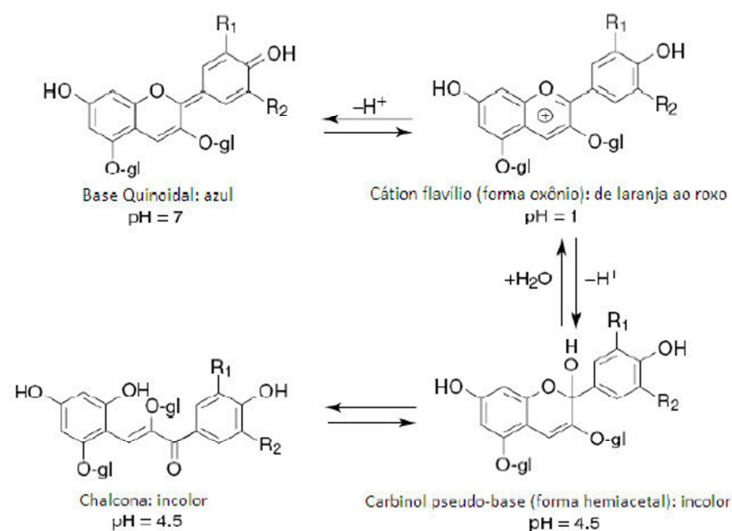


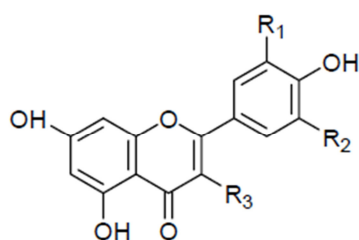
Figura 6 – Estrutura das antocianinas em diferente pH (*adaptado* de Giusti e Wrolstad, 2001; Malacrida e Motta, 2006)

O aquecimento, durante o processamento dos alimentos, consegue destruir rapidamente as antocianinas. Muitos estudos demonstraram existir uma relação logarítmica entre a destruição das antocianinas e o aumento da temperatura. Os processos utilizando pouco tempo com altas temperaturas, têm sido recomendados para a melhor retenção dos pigmentos (Mori et al., 2007; Yamane et al., 2006). Durante a pasteurização as perdas de antocianinas são relativamente baixas, porém durante a concentração, as perdas são superiores a 20% (Skrede et al., 2000).

O oxigênio pode causar degradação das antocianinas por mecanismos de oxidação direta ou indireta, quando constituintes oxidados do meio reagem com as mesmas. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado pela oxidação do ácido ascórbico na presença de oxigênio e iões cobre, causa descoloração das antocianinas (Malacrida e Motta, 2006). Uma alternativa para explicar a degradação das antocianinas é a ocorrência de reações de condensação entre o ácido ascórbico e a antocianina, formando produtos instáveis que se degradam em compostos incolores (Wrolstad et al., 2005).

1.2.3. Flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e flavanóis

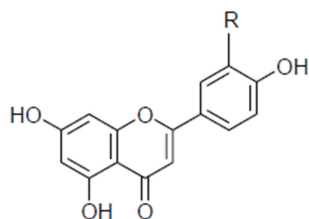
Os flavonóis são dos compostos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo a quercetina e o canferol os encontrados em maiores concentrações. Estes compostos estão presentes em variadíssimos alimentos, por exemplo na maçã, brócolos, alho, etc. A estrutura básica da aglicona dos flavonóis difere da estrutura das flavonas, a posição C-3 é hidroxilada/glicosilada. As agliconas mais comuns são o canferol, a miricetina e a quercetina (figura 7). Estes compostos são normalmente encontrados na forma glicosilada nas plantas, tal como outros flavonóides, apresentam-se também sob a forma de mono e dissacáridos. Podem ocorrer outras variações na estrutura, nomeadamente, acilação com ácidos aromáticos e alifáticos, metoxilação e prenilação (Harborne e Williams, 2000; Manach et al., 2005; Stefova et al., 2001; Williams e Grayer, 2004).



Flavonóis	R ₁	R ₂	R ₃
Canferol	H	H	OH
Quercetina	OH	H	OH
Miricetina	OH	OH	OH
Rutina	OH	H	O-rutinósido
Quercitrina	OH	H	O-ramnósido

Figura 7 – Estrutura de alguns flavonóis mais comuns nos frutos

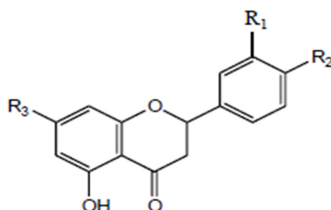
As flavonas são os compostos fenólicos menos encontrados na natureza, mesmo assim estão presentes, por exemplo na salsa, camomila ou no aipo. São semelhantes estruturalmente às flavanonas, conforme indicado pela presença de um grupo carbonilo no C-4, contudo, são insaturadas entre C-2 e C-3 no anel C (figura 8). As duas agliconas mais comuns são a apigenina e a luteolina. Cerca de 700 flavonas foram identificadas em plantas com variação na acilação, glicosilação, hidroxilação, metilação e sulfatação nos anéis aromáticos (Manach et al., 2004; Williams e Grayer, 2004).



Flavonas	R
Apigenina	H
Luteolina	OH

Figura 8 – Estrutura das flavonas Apigenina e Luteolina

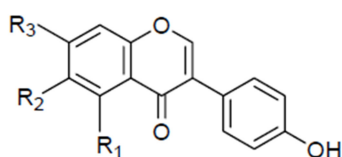
As flavanonas são compostos relacionados com as flavonas, diferindo no estado de oxidação, devido à existência ou não de ligação dupla no anel C. Os compostos com maior expressão são hesperetina e a naringenina e estão presentes maioritariamente nas frutas cítricas (Hahn-Obercyger et al., 2005). As flavanonas são caracterizadas pela presença de um grupo carbonilo no C-4 do anel C (figura 9). As agliconas que ocorrem mais frequentemente são a hesperedina, hesperitina e naringenina. Existem numerosas variações estruturais nas flavanonas, principalmente a acilação, glicosilação, hidroxilação, metilação e metoxilação no anel A e B. A glicosilação de flavanonas ocorre tipicamente na posição C-7 (anel D) (Grayer e Veitch, 2005).



Flavanonas	R ₁	R ₂	R ₃
Hesperedina	OH	H	OH
Hesperetina	OH	OCH ₃	OH
Naringenina	H	OH	OH

Figura 9 – Estrutura das flavanonas mais comuns nas plantas

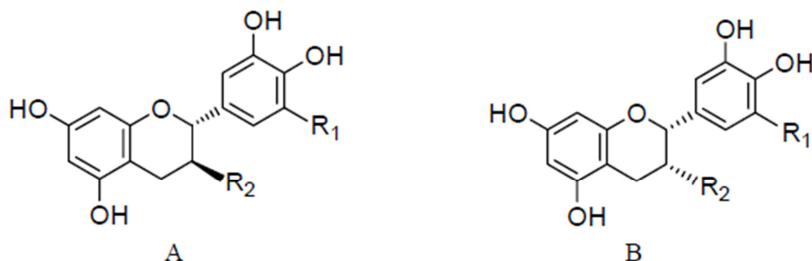
As isoflavonas são isômeros estruturais das flavanonas. São caracterizadas pela ligação do anel B ao C no C-3, em vez de C-2 (figura 10). As isoflavonas mais comuns ocorrem como agliconas, glicosídeos, acetil-glicosídeos e malonil-glicosídeos. As agliconas diadzeina, genisteína, gliciteína e os seus glucósidos são as principais isoflavonas encontradas principalmente na soja. Existem em grandes quantidades na natureza e a sua estrutura pode confundir-se com hormonas esteroides (Cassidy et al., 2006).



Isoflavonas	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzeina	H	H	OH
Daidzina	H	H	O-glucósido
Genisteína	OH	H	OH
Genistina	OH	H	O-glucósido
Gliciteína	H	OCH ₃	OH
Glicitina	H	OCH ₃	O-glucósido

Figura 10 – Estrutura das isoflavonas mais comuns nas plantas

Os flavanóis possuem um anel C saturado com um grupo hidroxilo ou galoil ligado no C-3 (figura 11). Estes estão presentes, maioritariamente, como agliconas, ao contrário da maioria dos flavonóides, que estão presentes na forma glicosilada. Os compostos mais comuns são a (+)-catequina e (-)-epicatequina, e encontram-se em grandes teores no chá e no vinho tinto. Estes compostos são referidos como catequinas quando encontrados como unidades individuais e proantocianidinas quando complexados como polímeros (Manach et al., 2005; Scalbert et al., 2005).



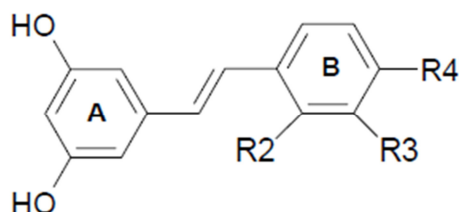
Flavanóis	R ₁	R ₂
(+)-catequina/(-)-epicatequina	H	OH
(+)-galhato de catequina/(-)-galhato de epicatequina	H	O-galhato
(+)-Galhocatequina/(-)-epigalhocatequina	OH	OH
(+)-galhato de galhocatequina/(-)- galhato de epigalhocatequina	H	OCH ₃

Figura 11 – Estrutura dos flavanóis mais comuns nas plantas

Os flavanóis monoméricos podem ser hidroxilados na posição C-4, ou então apresentarem um grupo hidroxilo adicional na posição C-3 no anel C, e são identificados como flavan-4-óis e flavan-3,4-dióis, respetivamente. Estes compostos, também conhecidos como leucoantocianidinas são convertidos em antocianidinas por clivagem do grupo hidroxilo no anel C sob aquecimento com ácido (Ferreira et al., 2006).

1.3. Estilbenos

Os estilbenos também possuem um esqueleto C6-C2-C6, contendo o 1,2-difeniletileno como grupo funcional (figura 12). O anel A geralmente possui dois grupos hidroxilo na posição *meta*, enquanto o anel B está substituído por grupos hidroxilo e metoxilo nas posições *orto*, *meta* e/ ou *para*. O membro mais abundante desta família é o resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) abundante em uvas, amendoins, e em algumas frutas, e pode ocorrer em ambas as formas, livre e glicosilado (Cassidy et al., 2000).



Estilbenos	R ₂	R ₃	R ₄
Resveratrol	H	H	OH
Piceatanol	H	OH	OH

Figura 12 – Estrutura básica dos estilbenos

Estilbenos são biossintetizados a partir das duas vias já referidas anteriormente. A unidade de partida é a cinamoil-CoA da via do ácido chiquímico. A extensão da cadeia lateral é conseguida através de hidrólises e uma descarboxilação pela enzima estilbeno sintase até a obtenção dos estilbenos (Dewick, 2002).

1.4. Taninos

Os taninos estão presentes em muitas frutas e vegetais, para além de exibirem as reações típicas dos compostos fenólicos, caracterizam-se por provocar a precipitação de alcaloides, proteínas e polissacáridos. São compostos com alto peso molecular, que contêm alguns grupos hidroxilo, que permitem a formação de ligações cruzadas e estáveis com proteínas (Silva et al., 1999; Taiz et al., 2004; Chitarra et al., 2005). É esta ligação a proteínas, alcaloides e polissacáridos que confere adstringência a alguns alimentos. A adstringência está relacionada com o grau de polimerização e ocorre em compostos com peso molecular entre 500 e 3000 Da. (Haslam, 2007; Khanbabaee e van Ree, 2001; Hagerman, 2002). Os compostos simples, como os ácidos hidroxicinâmicos, catequinas e antocianinas, não são adstringentes, enquanto que os dímeros e oligómeros apresentam essa característica, que é reduzida com o aumento do tamanho do polímero (Chitarra et al., 2005).

De acordo com a sua estrutura e propriedades químicas, os taninos são classificados em hidrolisáveis (galhotaninos e elagitaninos), não hidrolisáveis ou condensados, e complexos (Singleton et al., 1973).

1.4.1. Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis, constituídos pelos galhotaninos e elagitaninos, apresentam uma estrutura comum formada por um poliol como núcleo central cujos grupos hidroxilos se encontram parcial ou totalmente esterificados por grupos fenólicos de, ou derivados, do ácido gálgico. O poliol mais comum é a D-glucose (Jorge et al, 2001; Khanbabaee e van Ree, 2001). Os galhotaninos são os taninos hidrolisáveis mais simples, menos abundantes na natureza e podem ser descritos como ésteres do ácido gálgico (figura 13) e/ou do ácido digálgico. Os elagitaninos são taninos constituídos por um poliol central ligado a pelo menos uma unidade de ácido hexahidroxidifenólico. Por hidrólise, este ácido fica livre e converte-se espontaneamente em ácido elágico (figura 13). Existe uma grande variedade de elagitaninos e são, por isso, muito mais comuns na natureza do que os galhotaninos. Estes são os principais taninos presentes em espécies vegetais (Khanbabaee e van Ree, 2001).

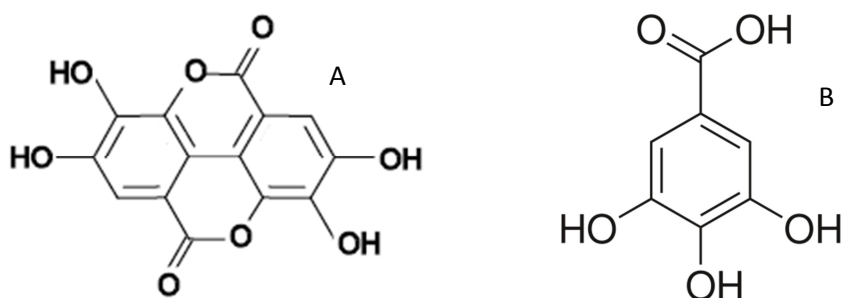


Figura 13 – Estrutura do ácido elágico (A) e do ácido gálgico (B)

1.4.2. Taninos condensados

Os taninos condensados ou proantocianidinas podem ser oligoméricos ou poliméricos, solúveis ou insolúveis em água, e são formados pela condensação sucessiva de duas a mais de cinquenta unidades de flavanóis: catequina, epicatequina, galhocatequina, epigalhocatequina. A condensação oxidativa ocorre entre o carbono C-4 do anel C e o carbono C-6 ou o carbono C-8 do anel A com unidades de flavanóis adjacentes (Cos et al., 2003; Khanbabaee e van Ree, 2001; Hagerman, 2002; Santos-Buelga et al. 2000).

O termo proantocianidinas, deriva do fato destas libertarem antocianidinas, quando aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico, mediante a rutura das ligações estabelecidas entre as

unidades monoméricas (figura 14). As estruturas poliméricas são classificadas de acordo com seu padrão de hidroxilação: procianidina (3,5,7,3',4'-OH), prodelfinidina (3,5,7,3',4',5'-OH), propelargonidina (3,5,7,4'-OH), entre outras. As mais comuns na natureza são a procianidinas e prodelfinidina, como tal são as mais estudadas. As procianidinas são polímeros de catequina e/ou epicatequina que, após rutura, libertam monómeros de cianidina. Enquanto que as prodelfinidinas são polímeros de galhocatequina e/ou epigalhocatequina que, após rutura, libertam monómeros de delfinidina. De acordo com o aumento do grau de polimerização, estes compostos são definidos como dímeros, trímeros, oligómeros e polímeros (Cooper et. al., 2008; Khanbabaee e van Ree, 2001; Hagerman, 2002; Passos et al., 2010; Santos-Buelga et al. 2000).

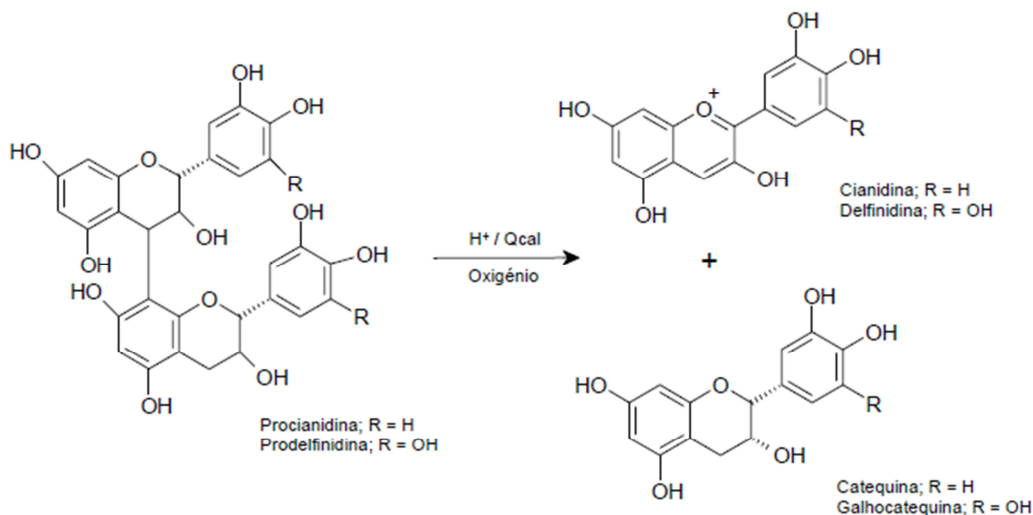


Figura 14 – Reação de decomposição das proantocianidinas (Bate-Smith, 1962)

As proantocianidinas mais comuns na natureza são sobretudo as procianidinas, ligadas pelas posições C4 e C8, que por sua vez, podem ser classificadas de acordo com o número de subunidades e modos de ligação: procianidina A, B (dímero), C (trímero), D (tetrâmero), entre outras. Cada subgrupo apresenta variações quanto à estereoquímica de suas ligações (Cooper et. al., 2008; Ferreira, 2006).

As procianidinas diméricas do tipo A (figura 15) possuem uma ligação do tipo C4-C8 acrescida de uma ligação éter entre o grupo hidroxilo do carbono 5 ou 7 do anel A de uma unidade e o carbono 2 do anel pirano da outra unidade (Cooper et. al., 2008; Ferreira, 2006).

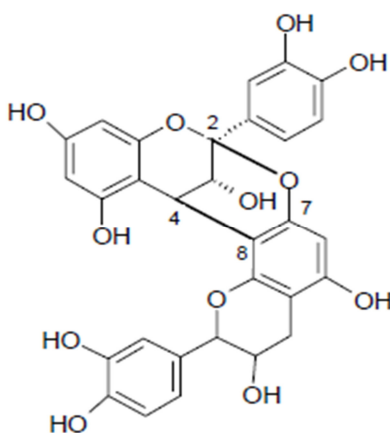
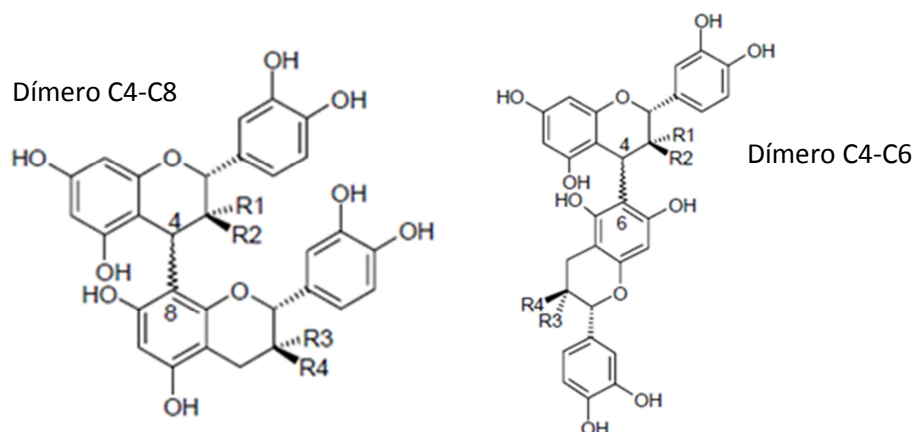


Figura 15 – Procianidinas diméricas do tipo A. Procianidina A2 (C4-C8 e C2-O7)

As procianidinas diméricas de tipo B (figura 16) possuem apenas ligações interflavanólicas covalentes entre o carbono 4 de uma unidade flavan3-ol e o carbono 8 ou 6 da outra unidade. São

ainda classificadas, numericamente, de acordo com a estereoquímica do carbono 3 do anel C de cada uma das unidades (Cooper et. al., 2008; Ferreira, 2006).



Dímeros C4-C8	Dímeros C4-C6	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
B1	B5	OH	H	H	OH
B2	B6	OH	H	OH	H
B3	B7	H	OH	H	OH
B4	B8	H	OH	OH	H

Figura 16 – Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B

As procianidinas triméricas (figura 17) são também divididas de acordo com o tipo de ligação interflavanólica em procianidinas de tipo C e D que possuem respectivamente duas ligações interflavanólicas de tipo B ou uma de tipo B e outra de tipo C (Cooper et. al., 2008; Ferreira, 2006).

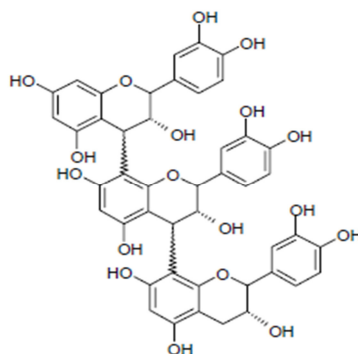


Figura 17 – Estrutura das procianidinas triméricas (C1)

Para além das estruturas monoméricas, diméricas e triméricas existem formas mais polimerizadas de proantocianidinas; os oligómeros que apresentam até 6 unidades de monómeros e os polímeros compostos por mais de 6 monómeros. Em ambos podem existir ligações de tipo C₄-C₈ e C₄-C₆ que permitem a formação de um número ilimitado de isómeros. As proantocianidinas oligoméricas são solúveis em diferentes meios, aquosos e orgânicos, o mesmo, no entanto, não é observado nos taninos condensados de alta massa molecular. Esta insolubilidade é fonte de erros na quantificação de polifenóis em plantas pois os extratos negligenciam a fração insolúvel. (Khanbabaee e van Ree, 2001; Hagerman, 2002; Passos et al., 2010).

Os taninos condensados não sofrem hidrólise, mas em presença de ácidos fortes e com oxidação libertam antocianidinas de cor vermelha e substâncias de cor vermelha acastanhada, designadas por flobafenos (Covington, 2006).

1.5. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

Biodisponibilidade define-se como a velocidade e extensão da absorção de um composto. Inclui a absorção, distribuição pela corrente sanguínea, metabolização e a sua presença num determinado órgão-alvo. A biodisponibilidade de uma substância depende de um conjunto de fatores: solubilidade, permeabilidade, estabilidade no trato gastrointestinal e biotransformação antes de atingir a circulação sanguínea, quando ingerida por via oral (Meskin et al., 2004; Ratnam et al., 2006). O conhecimento da biodisponibilidade dos polifenóis constitui um fator chave para poder sugerir que os antioxidantes presentes nos alimentos possam, de facto, conferir uma maior proteção contra o *stress* oxidativo de quem os consome. Efetivamente, para que estes compostos possam apresentar efeitos *in vivo*, têm que chegar aos tecidos, na sua forma nativa ou na forma metabolizada, numa dose suficientemente elevada para poder exercer efeito biológico (Galvano, 2008; Manach et al., 2004).

A biodisponibilidade difere grandemente entre os vários tipos de polifenóis, e os mais abundantes nos alimentos ou os que apresentam uma maior ação antioxidante *in vitro*, podem não ser necessariamente os que apresentam maior biodisponibilidade, não sendo por isso os que atingem maiores concentrações no interior das células humanas. A baixa biodisponibilidade de alguns compostos pode ocorrer devido a vários fatores: baixa resistência à digestão; baixa absorção no intestino; elevada metabolização; ou rápida eliminação (Manach et al., 2004; Pantelidis et al., 2007).

Como referido anteriormente nos alimentos os flavonóides existem como 3-O-glucósidos e polímeros. A ligação β estabelecida entre a unidade glicosídea e a aglícóna é resistente à hidrólise enzimática das enzimas pancreáticas, podendo ser hidrolisada por ação da flora intestinal e por ação de β -endoglucosidases intestinais (Heim et al., 2002).

A absorção intestinal dos flavonóides varia consideravelmente com o alimento onde se encontram e com a diversidade de resíduos de açúcares e de outros grupos funcionais ligados à estrutura base. Dependendo do açúcar a que se encontram ligados, os flavonóides glicosilados podem ou não ser mais facilmente absorvidos do que as respetivas aglícónas. A absorção pode também depender da dose, do veículo de administração, da dieta, da microflora do cólon e pode, ainda, variar com o sexo (Heim et al., 2002). A sua absorção pode também ser aumentada com a co ingestão de alimentos ricos em gordura. Estima-se que apenas 5% dos flavonóides ingeridos atinjam a circulação sanguínea, ligam-se aí às proteínas e às membranas celulares das células sanguíneas (Ruel e Couillard, 2007).

Os flavonóides presentes nos alimentos estão principalmente na forma glicosilada, mas também podem estar na forma de ésteres ou polímeros (Manach, et al., 2004). No ambiente de baixo pH do estômago, pode ocorrer a quebra dos flavonóides oligoméricos como as procianidinas, mas a primeira e determinante alteração que genericamente sofrem no organismo ocorre no tubo gastrointestinal, principalmente no intestino, onde as glucosidases hidrolisam estes compostos, libertando aglícónas. A lactase florizina hidrolase (LPH), uma β -glucosidase membranar que se encontra presente na porção apical dos enterócitos (células intestinais) nos mamíferos, além de hidrolisar a lactose, é capaz de hidrolisar eficazmente uma vasta gama de heterósidos de flavonóis e de isoflavonas. Após a hidrólise do heterósido, a aglícóna mais hidrofóbica pode difundir-se para as células epiteliais, enquanto que a glucose é transportada pelo transportador de glucose dependente do sódio (SGLT1) que nos enterócitos se encontra na proximidade da enzima LPH. A absorção dos compostos que não sofrem hidrólise ocorre com o envolvimento de transportadores, ou seja, ocorre por absorção ativa. Entre os transportadores envolvidos estão os transportadores de glucose (GLUTs e SGLTs) (Barnes et al., 2004). A hidrólise pela enzima LPH demonstra uma metabolização pré-sistêmica dos polifenóis e sendo assim, além da absorção ativa, muitos outros mecanismos podem estar envolvidos na disponibilidade de tais compostos. (Day et al., 2000; Murota et al., 2003).

Os compostos ingeridos na forma de aglicona são normalmente absorvidos por difusão passiva e metabolizados pelo fígado. As agliconas livres, sendo mais lipofílicas que os precursores conjugados, são mais eficazmente absorvidas nos enterócitos também por difusão passiva. As reações de Fase I (hidrólises), no intestino, condicionam assim fortemente a absorção dos flavonóides veiculados na dieta (Prasain et al., 2007; Zhang et al., 2007). Quando os compostos fenólicos estão ligados a compostos insolúveis, como as fibras, a hidrólise ocorre por ação das enzimas bacterianas, através da fermentação no cólon. Estes compostos são, portanto, absorvidos mais lentamente, sendo sujeito às condições da microflora (Scalbert e Williamsom, 2000; Walle, 2004).

Para além das reações de fase I que ocorrem no intestino delgado, também ocorrem reações metabólicas de fase II nos enterócitos, incluindo a glucuronidação, sulfatação e O-metilação de grupos catecólicos, por enzimas como a UDP-glucuroniltransferase, fenol sulfotransferase e catecol-O-metiltransferase. Para apoiar esta ideia, alguns estudos demonstram que, após ingestão oral dos derivados glicosídeos, na corrente sanguínea circulam principalmente os conjugados glucuronídeos, sulfatos, ou metilados, encontrando-se os conjugados glicosídeos e as respetivas agliconas ausentes ou em concentrações muito baixas (Zhang et al., 2007). O intestino delgado é assim um órgão muito ativo na glucuronidação dos flavonóides, sendo também importante na metilação, o que faz com que seja considerado o órgão que realiza o metabolismo de primeira passagem. O fígado é muito importante na sulfatação, mas também apresenta um papel importante na glucuronidação e metilação (Donovan et al., 2001).

A figura 18 pretende ilustrar de forma muito simplificada a biodisponibilidade dos flavonóides e as reações que ocorrem desde a ingestão até à sua eliminação.

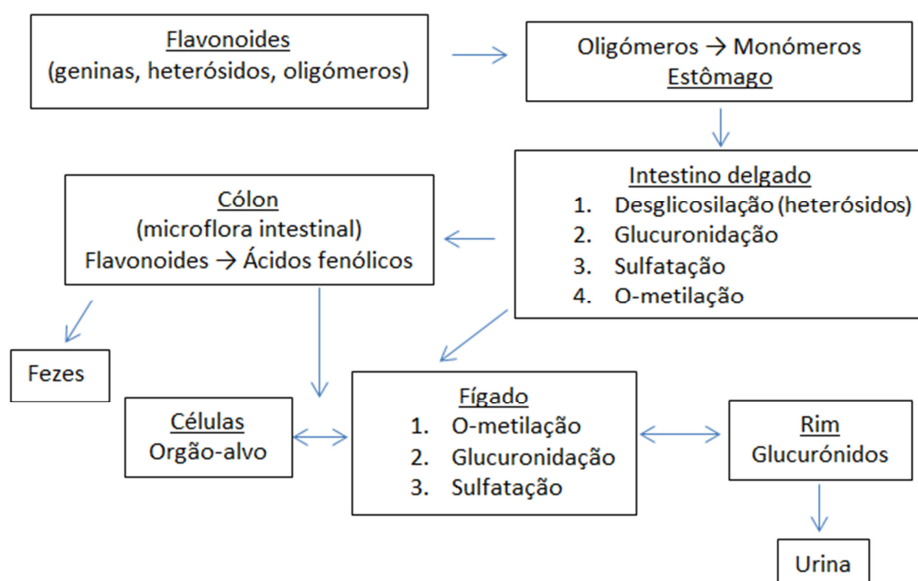


Figura 18 – Esquema simplificado da biodisponibilidade dos flavonóides (*adaptado* de Walle, 2004 e Zhang et al., 2007)

Para além das reações hidrolíticas de fase I, da absorção das agliconas nos enterócitos e subsequentes reações de fase II (glucuronidações e metilações), há que entrar em linha de conta com os efeitos das bombas de efluxo presentes nos enterócitos e que desempenham um importante papel na excreção dos compostos, livres ou conjugados, no lúmen intestinal (Manach et al., 2004). Os heterósidos podem entrar nas células intestinais mas são facilmente exportados por transportadores de membrana como o MRP-2 (Multidrug resistance-associated protein-2) (Murota et al., 2003).

A hidrólise de compostos glicosilados pode ser atribuída aos microrganismos intestinais e à sensibilidade dos compostos aos diferentes pHs do estômago e intestino (Williamson, 2004), tal

como a enzima lactose florizina hidrolase (LPH), referida anteriormente. Estes fenómenos comprovam a dificuldade que as estruturas glicosiladas têm para se deslocarem até ao plasma, dando a ideia que a desglicosilação é essencial para a absorção dos flavonóides (Crespy et al., 2002; Day et al., 2000; Walle et al., 2000; Heilmann e Merfort, 1998^a, 1998b), bem como para as reações metabólicas de Fase II, como a glucuronidação (Williamson, 2004; Crespy et al., 2002; Day et al., 2000; Walle et al., 2000). Contudo, alguns autores demonstraram que é possível a absorção de flavonóides glicosilados a partir de estruturas transportadores de açúcares, como o SGLT1 (Williamson, 2004; Walle e Walle, 2003; Gee et al., 2000).

No sentido de reforçar as evidências da metabolização pré-sistémica, verificou-se que para além da libertação das aglíconas por hidrólise enzimática, foi sugerida a hipótese de que o flavonóide poderia também sofrer uma cisão no anel flavónico antes da absorção e portanto, seriam absorvidos como ácidos. Sendo assim, tanto a aglícona como os respetivos fragmentos fenólicos seriam absorvidos (Chang et al., 2005).

A metabolização pela flora intestinal pode, igualmente ter um efeito preponderante na biodisponibilidade dos polifenóis. Os metabolitos que não forem absorvidos no trato gastrointestinal, bem como os metabolitos conjugados excretados na biliar podem ser metabolizados por estas bactérias, originando metabolitos, passíveis de ser absorvidos no epitélio do cólon e, desta forma, chegar à corrente sanguínea. A degradação completa ocorre pela quebra do anel pirano produzindo-se ácidos fenólicos simples, estes compostos podem ser absorvidos e posteriormente metabolizados no fígado (Manach et al., 2004; Spencer et al., 2004). As proantocianidinas são exemplo disso, têm demonstrado alguns efeitos em ensaios epidemiológicos embora se saiba que a sua absorção intestinal seja muito reduzida. Desta forma, é possível que os efeitos biológicos associados a estes compostos resultem de algum metabolito que ocorre no decurso da sua metabolização pelas bactérias da flora intestinal (Williamson e Manach, 2005).

Após a absorção, os compostos na forma de aglíconas são metabolizados e embora ocorra maioritariamente no fígado, no intestino também ocorrem algumas metabolizações, uma vez que existem muitas enzimas de conjugação. A presença de derivados metoxilados tanto no plasma como no intestino pode ser o resultado da ação da catecol-O-metiltransferase intestinal. Os derivados conjugados e 3'-O-metilados foram detetados no plasma de animais que ingeriram flavonóides, flavanóis e isoflavonas. Além da metoxilação, os flavonóides também aparecem na forma conjugada com ácido glucurónico no intestino delgado. A glucuronidação de flavonóides no intestino depende da estrutura. Flavonóides com um grupo hidroxilo substituído no anel B são menos conjugados com o ácido glucurónico em comparação com os flavonóides com 3,4'-orto-dihidroxilo no anel B. A conjugação dos polifenóis com o ácido glucurónico é catalisada pela UDP glucuronosil transferase, no retículo endoplasmático do intestino, fígado e rim (Crespy et al., 2002; Spencer et al., 1999). Após alcançarem a circulação sanguínea, muitos dos flavonóides absorvidos são transportados ao fígado ligados à albumina, enquanto que os flavonóides lipossolúveis são provavelmente absorvidos pela circulação linfática. O fígado é o principal local de conversão enzimática, particularmente a metilação e a glucuronidação (Tsuda et al., 1999).

A excreção das aglíconas e dos compostos metabolizados pelo fígado é feita pelo rim ou pela biliar, podendo a partir daí ainda voltar ao intestino e retomarem o ciclo, através de um processo de reabsorção. Os fenólicos ligados a compostos insolúveis são encontrados em maior quantidade nas fezes, demonstrando resistência à digestão e absorção intestinal (Scalbert e Williamsom, 2000).

Os polifenóis apresentam uma biodisponibilidade limitada e podem ser extensamente metabolizados. No entanto, apesar desta limitada disponibilidade, estudos efetuados em humanos sugerem que mesmo essa pequena quantidade absorvida possa ser suficiente para exercer efeitos benéficos na saúde (Ferguson, 2001; Williamson e Manach, 2005). Por exemplo, os níveis de quercetina no sangue após a ingestão de cebolas, de catequinas após a ingestão de vinho tinto ou de isoflavonas veiculadas pela soja atingem concentrações da ordem dos micromolar, ou seja

concentrações semelhantes àquelas em que exercem os seus efeitos protetores nos ensaios *in vitro* (Williamson e Manach, 2005).

Os compostos mais polimerizados, nomeadamente os taninos, são os que apresentam maior afinidade para interagir com as proteínas, e por essa razão têm a capacidade de se ligarem a enzimas digestivas inibindo o seu efeito no processo digestivo, exercendo um efeito anti nutricional. As enzimas digestivas estão ligadas ao metabolismo de carboidratos (α -amílase, α -glucosidases), de lípidos (lipase pancreática e gástrica) e de proteínas (tripsina e proteases diversas), podendo também complexar as proteínas da dieta que deixam de estar acessíveis às proteases (McDougall et al. 2005).

Relativamente às antocianinas, estas podem ser absorvidas sem hidrólise prévia, isto é, na sua forma glicosilada (Prior, 2003). Ensaios *in vitro* sugerem que estas podem servir de ligantes para outro tipo de enzimas, nomeadamente a enzima bilitranslocase (transportador de aniões orgânicos presentes nas células epiteliais da mucosa gástrica). Este facto sugere que esta enzima seja determinante na absorção destes compostos, entretanto o mecanismo exato de absorção das antocianidinas ainda não está totalmente esclarecido (Passamonti et al., 2002). Quanto à metabolização das antocianidinas, mais de 50% dos compostos ingeridos são degradados ou desaparecem no lúmen intestinal em poucas horas após a ingestão, demonstrando a existência de metabolismo no intestino (Prior, 2003). Outros estudos *in vitro/in vivo* indicam que após administração oral, as antocianinas são absorvidas e atravessam a barreira hematoencefálica após aproximadamente 23 horas de suplementação, e podem efetivamente exercer efeitos sobre o sistema nervoso central (Passamonti et al., 2003; Youdim et al., 2003, 2004).

O ácido gálico e as isoflavonas parecem ser os compostos fenólicos mais facilmente absorvidos, seguidos pelas catequinas, nomeadamente a (+)catequina, (-)epicatequina, (-)-epigallocatequina (EGC), flavanonas e glicosídeos de quercetina. Sendo que as proantocianidinas, as catequinas galhato e as antocianinas, são de mais difícil absorção (Manach et al., 2005; Pantelidis et al., 2007; Galvano, 2008).

Breinholt et al. (2002) propôs uma teoria universal na biotransformação dos flavonóides, independentemente da classe ou do local de metabolização. Estudaram a ação, *in vitro*, de isoenzimas hepáticas humanas e de camundongos (citocromo P450) sobre os flavonóides e constataram que os primeiros locais onde ocorrem biotransformações são nas posições 3' e 4' do anel B, resultando num composto 3',4'-dihidroxilado no anel B. Os metabolitos formados são geralmente menos ativos que os compostos originais, porém essa regra pode ter exceções quando os metabolitos dos flavonóides adquirirem um potencial antioxidante superior ao composto original. Isto ocorre devido à hidroxilação 3' e 4' do anel B dos metabolitos, que cria uma estrutura mais favorável para a deslocalização eletrónica e portanto mais ativa no que se refere ao potencial antioxidante.

Para a extrapolação dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* para a realidade *in vivo* é essencial o conhecimento da biotransformação destes compostos. Com efeito, a biotransformação, ao alterar a estrutura dos compostos químicos, pode originar metabolitos com propriedades bioativas diferentes das dos compostos originais (Heim et al., 2002; Martínez-Flórez, et al., 2002). Desta forma, os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* realizados com os alimentos podem não ser necessariamente relevantes para a situação *in vivo* (Williamson e Manach, 2005).

2. Radicais livres e o stress oxidativo

A evolução de processos metabólicos aeróbicos, como, por exemplo, a respiração, leva à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), em diversas estruturas celulares, como, por exemplo, as mitocôndrias ou os peroxissomas. Essas ROS têm demonstrado capacidade para causar danos em diversas biomoléculas, como, por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos ou lípidos (Apel e Irt, 2004; Migliore e Coppedè, 2009).

Para fazerem frente aos problemas criados pelas ROS, os organismos desenvolveram sistemas de defesa onde participam enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase) e antioxidantes como o α -tocoferol, ácido ascórbico, ácido úrico, glutatona e outros maioritariamente assimilados pela alimentação (Aguiló et al., 2005; Freitas et al., 2008). Como os componentes celulares não estão totalmente protegidos pelos antioxidantes endógenos pensa-se, cada vez mais, que os antioxidantes obtidos através da dieta são indispensáveis na defesa do organismo e portanto, têm um papel importante na saúde (Cerqueira et al., 2007).

O *stress* oxidativo é definido como o desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes com favorecimento para os oxidantes, causando danos (Mi Yoo et al., 2008; Neves et al., 2009). Este fenómeno pode resultar numa diminuição da quantidade de antioxidantes devido a uma produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (de origem endógena ou exógena) ou de uma alimentação deficiente (Krishnaiah et al., 2010; Pieniz et al. 2009). Este excesso de espécies reativas é também responsável pela inibição de enzimas com capacidade antioxidante, o que provoca a oxidação celular e, como tal, dá início a um conjunto de reações em cadeia que, por sua vez, perpetuam a produção desmesurada de radicais (Mesa-Vanegas et al., 2010). Quando um sistema biológico é sujeito a situações de *stress* oxidativo pode reagir aumentando a síntese dos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, a exposição a estas condições de *stress* mais severo pode levar a lesões oxidativas fisiopatológicas (Katalinic et al., 2006).

A produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RAS), entre outras, faz parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas situações fisiológicas. As ROS e RAS desempenham funções biológicas importantes, como por exemplo na fagocitose, estas são produzidas para eliminar o agente agressor (Mancini-Filho et al., 2006), mas podem também reagir de forma prejudicial com biomoléculas, tais como proteínas, hidratos de carbono, lípidos e ácidos nucleicos. Assim, o *stress* oxidativo pode resultar em três diferentes processos: adaptação por regulação do sistema de defesa antioxidante; dano tecidual; e morte celular por apoptose (Halliwell, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007).

As ROS incluem espécies radicalares de oxigénio, como o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}), radical peroxilo (ROO^{\bullet}), radical alcóxido (RO^{\bullet} ou LO^{\bullet}), e espécies não radicalares, como, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), oxigénio singlete (O_2), ácido hipocloroso ($HClO$), ácido hipobromoso ($HBrO$), e ozono (O_3). As RAS incluem para além do peroxinitrito ($ONOO^-$), o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e o radical dióxido de azoto ($^{\bullet}NO_2$), mas também incluem espécies não radicalares, nomeadamente o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o alquilo peroxinitrito ($ROONO$) (Mancini-Filho et al., 2006; Tawaha et al., 2007). Assim, todas as espécies tóxicas de oxigénio são ROS mas nem todas as ROS são radicais livres de oxigénio (Halliwell e Chirico, 1993; Sorg, 2004; Buonocore et al., 2010).

Todos os componentes celulares estão expostos aos radicais, sendo que os ácidos gordos polinsaturados das membranas são os mais vulneráveis desencadeando uma série de reações denominadas de peroxidação lipídica (lipoperoxidação, LPO) (Blokina et al., 2003; Stocker e Keaney, 2004). Este processo de oxidação lipídica leva a alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana celular, alterando o fluxo iónico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes, de substâncias tóxicas à célula e libertação do conteúdo dos organelos (como enzimas hidrolíticas dos lisossomas), alterações do ADN, oxidação do LDL-colesterol e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colagénio e elastina), culminando na morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As ROS são produzidas durante processos que podem ser de extrema importância, como por exemplo na ativação do sistema imunológico, da resposta inflamatória ou na destoxificação de drogas (Schneider et al., 2004). Contudo, quando existe um desequilíbrio entre a produção e a remoção destas espécies, podem ocorrer vários eventos nocivos (figura 19), como a apoptose/necrose de células saudáveis, o envelhecimento precoce, a alteração da função celular,

enfraquecimento do sistema imunitário, e o aparecimento de patologias como doenças cardiovasculares, devido à oxidação da LDL, diabetes, artrite, malária, SIDA, cancro, devido às oxidação no ADN, cataratas, choques hemorrágicos, e doenças degenerativas como aterosclerose, Alzheimer ou Parkinson (Barreiros et al., 2006; Brenna e Pagliarini, 2001; Finaud, et al., 2006; Giada e Mancini Filho, 2006; Jung et al., 2008; Katalinic et al., 2006; Lim et al., 2004; Machado et al., 2008; Pereira et al., 2009; Tawaha et al., 2007; Touyz, 2004; Valko et al., 2007) e esclerose lateral amiotrófica (Migliore e Coppedè, 2009, Al-Gubory et al., 2010).

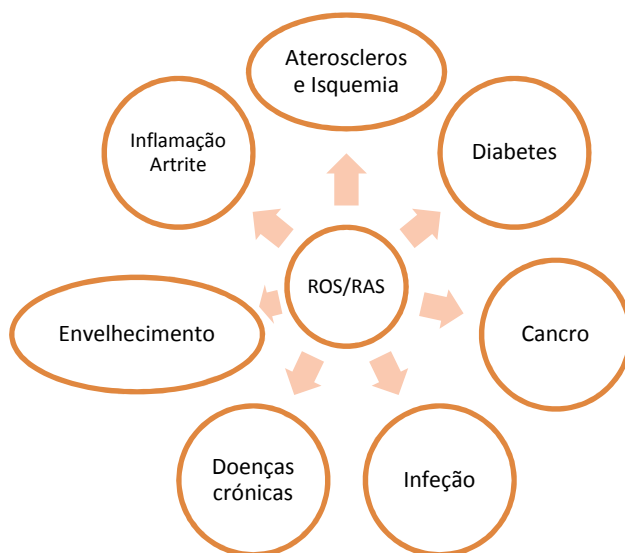


Figura 19 - Patologias causadas por espécies reativas de oxigénio e azoto

O *stress* oxidativo é um dos fatores, causador de danos celulares, mais estudado, e tem sido referenciado em muitos processos patológicos. Para ajudar os sistemas de defesa das enzimas antioxidantes endógenas são de extrema importância os antioxidantes exógenos como o α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), os compostos fenólicos e outros maioritariamente assimilados pela alimentação (Aguiló et al., 2005; Freitas et al., 2008).

3. Antioxidantes e a sua atividade protetora

Os antioxidantes são substâncias que em pequenas concentrações têm a capacidade de inibir ou retardar a oxidação de um substrato, tanto de moléculas simples como polímeros e biosistemas complexos (Elisia et al., 2007). As substâncias que protegem as células destes efeitos nocivos podem ser classificadas como antioxidantes enzimáticos/endógenos ou não-enzimáticos/exógenos (figura 20) (Ratnam et al., 2006). Estes compostos podem agir enzimaticamente como enzimas, moléculas de baixo peso molecular, e cofatores enzimáticos, nomeadamente a glutathione redutase (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), coenzima Q, e proteínas ligantes de metais como a albumina, metalotioneína, ceruloplasmina e transferrina (Barreiros et al., 2006; Halliwell e Getteridge, 2007; Soares, 2002). Os antioxidantes não enzimáticos podem ser sintéticos ou naturais, sendo estes últimos obtidos por via alimentar, como é o caso do tocoferol, β -caroteno (pró-vitamina A), vitamina C, compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides), compostos organossulfurados e minerais (Ratnam et al., 2006; Tawaha et al., 2007).

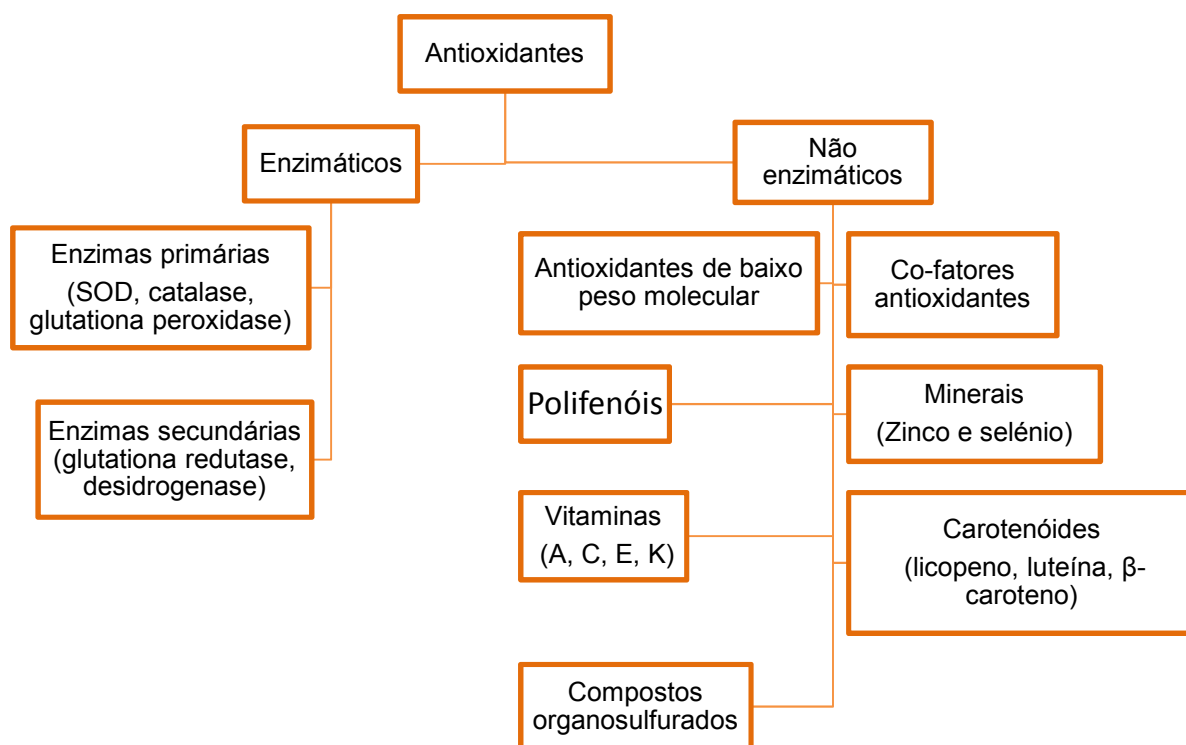


Figura 20 – Classificação dos antioxidantes (*adaptado de Ratnam et al., 2006*)

O organismo dispõe de um complexo sistema antioxidante capaz de prevenir ou retardar os processos de oxidação, estes são classificados em primários, secundários e terciários (Rahman et al., 2007). O sistema de defesa primário atua na inativação dos radicais livres antes que eles tenham oportunidade de iniciar reações de peroxidação (enzimas como a catalase e a superóxido dismutase, vitamina A, Riboflavina e proteínas sequestrantes de íons metálicos). O sistema secundário interfere nos radicais após ter ocorrido o início da reação de peroxidação em cadeia (ácido ascórbico, tocoferóis e carotenóides). E finalmente, o sistema de defesa terciário, é conhecido como o sistema de reparação e está constituído, basicamente, por enzimas que reparam os danos ocasionados em proteínas e no ácido desoxirribonucleico (ADN) (Rahman et al., 2006 e 2007; Sánchez-Moreno, 2002).

A propriedade antioxidante deve-se, principalmente, à estrutura fenólica dos compostos. A maioria destes compostos, com exceção dos tocoferóis, possuem grupos funcionais ativos na posição *orto* enquanto que nos antioxidantes sintéticos, com exceção dos galatos, esses grupos encontram-se na posição *para*, sem que haja alteração na ação antioxidante (Melo e Guerra, 2002). A eficiência do antioxidante é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos. O grupo alquila na posição *orto* ou *para* no anel aromático tem uma maior reatividade frente aos radicais livres. Os antioxidantes com o grupo etilo ou butilo na posição *para* tem maior atividade do que os antioxidantes com o grupo metilo. A presença de grupos com cadeias longas ou ramificadas reduz a atividade do antioxidante devido ao impedimento estrutural provocado por esses grupos, tornando o antioxidante menos acessível ao radical peróxido, embora, o radical fenóxido gerado seja mais estável (Melo e Guerra, 2002).

A presença de antioxidantes exógenos é de uma grande importância devido à insuficiência dos sistemas de defesa do organismo (Pereira et al., 2009). O efeito protetor atribuído às frutas deve-se à elevada variedade de constituintes com atividade antioxidante presentes na sua composição, como vitaminas e inúmeros metabólitos secundários, incluindo os ácidos fenólicos, flavonóides e outros polifenóis (Pietta, 2000; Havsteen, 2002).

Os antioxidantes desempenham as suas funções através de diferentes processos, são eles: redução da concentração dos radicais livres no organismo através da transferência de um átomo de hidrogénio (mecanismo HAT - Hydrogen Atom Transfer) ou por transferência de eletrões (mecanismo SET - Single Electron Transfer); capacidade de quelação de iões metálicos, em especial o Fe^{2+} e o Cu^{+} , evitando, deste modo, a formação de radicais hidroxilo através das reações de Fenton; impedem também que o oxigénio se ligue a moléculas suscetíveis; induzem enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e redutase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e a coenzima Q) que auxiliam nos mecanismos de proteção; inibem enzimas oxidativas como a xantina oxidase ou as ciclooxigenases (Gottlieb et al., 2009; Ferreira et al., 2010; Magalhães et al., 2008; Martínez-Flórez et al., 2002; Sellappan et al., 2002; Prior et al., 2005).

O desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende principalmente de fatores como: o tipo de radicais livres formados, onde e como é que são gerados, e quais as doses ideais para a proteção. Estes compostos, quando acumulados em quantidades apropriadas e em locais específicos ou compartimentos especializados (como α -tocoferol no lipoproteínas de baixa densidade plasmáticas ou nas membranas celulares), podem participar diretamente na inibição dos processos oxidativos. Assim, é possível um antioxidante atuar como protetor num determinado sistema, mas induzir lesões ou simplesmente deixar de proteger noutro sistema ou tecido (Halliwell et al., 1995).

Estes compostos, também podem exercer um papel protetor ao sequestrarem radicais livres presentes nos alimentos e/ou que se formem durante a digestão gastrointestinal, reduzindo a formação dos compostos potencialmente nocivos da oxidação lipídica (ALEs) ou produtos finais de glicosilação (AGEs) (Holst e Williamson, 2008).

3.1. Atividade antioxidante dos compostos fenólicos

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende do número e da posição dos grupos hidroxilo ligados ao grupo carboxilo. Os ácidos monohidroxibenzóicos com o grupo OH ligado nas posições *orto* ou *para* em relação ao grupo COOH não apresentam atividade antioxidante, porém, isso não acontece para o ácido m-hidroxibenzóico. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta com o aumento do grau de hidroxilação. Em contrapartida, a substituição dos grupos hidroxilo nas posições 3 e 5 por grupos metoxilo, como no caso do ácido sirínico, reduz a atividade. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que os ácidos hidroxibenzóicos correspondentes. Isso deve-se à presença do grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, que garante um elevado poder para doar iões H^{+} e estabilizar os radicais livres, comparativamente com o grupo COOH (Aberoumand e Deokule, 2008; Balasundram et al., 2006; Barreira et al., 2008).

Os flavonóides conseguem inativar os radicais livres em ambos os compartimentos celulares lipofílicos e hidrofílicos (Pereira et al., 2009). Os flavonóides mais lipofílicos possuem maior capacidade de serem incorporados pelas membranas biológicas, as quais são alvo de grande parte das espécies reativas. Ao serem assimiladas pelas membranas, estas moléculas exercem uma função de modulação de fluidez de forma a restringi-la, o que resulta num impedimento físico para os radicais que tentam atravessar as membranas (Barreiros et al., 2006).

A atividade antioxidante dos flavonóides e dos seus metabolitos também depende do arranjo dos grupos funcionais na sua estrutura base (grupos hidroxilos e metoxilos), nomeadamente por: inativarem aniões superóxido, oxigênio singlete, radicais peróxido de lipídios; estabilizarem ou sequestrarem radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes; e apresentam ainda a capacidade em quelar metais de transição (Balasundram et al., 2006; Barreira et al., 2008; Cai et al., 2006; Heim et al., 2002; Jiménez et al., 2009; Machado et al., 2008; Mi Yoo et al., 2008; Pereira et al., 2009).

A inibição da lipoperoxidação pelos flavonóides também aumenta com a sua lipofilicidade, devido à maior capacidade de penetração nas membranas biológicas e consequente capacidade de sequestro dos radicais iniciadores (Silva et al., 2002).

A configuração dos flavonóides em aglicona ou glicosídeo influencia a sua capacidade antioxidante. Segundo Cai et al. (2006), a glicosilação das moléculas flavonóides pode interferir na atividade antioxidante, pois estas estruturas apresentam uma reatividade mais reduzida na neutralização dos radicais livres em relação à aglicona correspondente. Alguns testes realizados demonstraram que a capacidade de captação dos radicais livres das flavanonas, flavonas e flavonóis podem ser organizadas, pela seguinte ordem decrescente: flavonol > flavona > flavanonas. Barreiros et al. (2006) defendem que deve haver pelo menos um flavonoide por ácido gordo para assegurar a proteção celular contra o ataque destas espécies reativas. Os flavonóides mais polares são os que apresentam uma cadeia de moléculas de açúcares ligada na sua estrutura, o que impede que sejam assimilados pela membrana. No entanto, os glicosídeos são passíveis de serem armazenados em vesículas o que faz com que permaneçam por muito mais tempo no organismo.

Nas antocianinas o potencial antioxidante também depende do número e da posição dos grupos hidroxilos e da sua conjugação com a estrutura (Galvano et al., 2004; Kuskoski et al., 2004). As agliconas possuem hidroxilação idêntica nos anéis A e C, compostas com um único grupo OH no anel B (4'-OH) incluindo pelargonidina, malvidina e peonidina e apresentam menor atividade antioxidante comparada com compostos que possuem as posições 3' e 4' substituídas por grupamentos OH, como delphinidina e cianidina 3-glucósido (Kuskoski et al., 2004). A eficácia das antocianinas está relacionada com o grau de hidroxilação, mas também diminui com a substituição por açúcares na posição C3, apresentando os glicosídeos menor atividade antioxidante do que as agliconas correspondentes (Galvano et al., 2004; Kuskoski et al., 2004).

3.1.1. Efeitos pró-oxidantes dos compostos fenólicos

Apesar de os compostos fenólicos não apresentarem praticamente nenhuma toxicidade nos mamíferos (Coutinho et al., 2009) é de salientar que nenhum composto é totalmente inócuo. Algumas pesquisas *in vitro* apresentaram evidências claras sobre a sua capacidade em interagir com os radicais livres, e em algumas circunstâncias desenvolvem efeitos pró-oxidantes (Sousa et al., 2007). Alguns dados sustentam que o mesmo flavonóide pode possuir uma dualidade de resultados, antioxidante e pró-oxidante, dependente da sua concentração e da fonte de radicais livres (Cao et al., 1997).

Esta ação pró-oxidante pode ocorrer na presença de certas substâncias, nomeadamente o óxido nítrico (NO), ou quando presentes em doses elevadas (Ohshima et al., 1998). Alguns compostos fenólicos podem, no decurso da sua regeneração, gerar radicais secundários reativos capazes de oxidar proteínas e lípidos. Radicais hidroxilo derivados de flavonóides semelhantes à quercetina iniciam a peroxidação de lípidos das membranas celulares e causam danos ao nível do ADN (Ohshima et al., 1998).

Alguns ensaios em animais de laboratório têm sugerido que os polifenóis possam apresentar atividade mutagénica e pró-carcinogénica, o que varia com o tipo de polifenol (Cao et al., 1997; Dicko et al., 2006). No entanto, a grande maioria deste tipo de ensaios apontam no sentido contrário, é possível que as enzimas de biotransformação, particularmente as da fase II, possam desempenhar um papel importante na limitação dos efeitos mutagénicos dos polifenóis *in vivo* (Scalbert et al., 2005).

O efeito pro-oxidante pode ter um lado positivo visto que, na prática, este comportamento eleva os níveis de defesa antioxidante e de enzimas metabolizadoras de xenobióticos por imposição de um grau médio de *stress* oxidativo, o que contribui para uma citoproteção mais eficaz (Halliwell, 2008).

4. Técnicas utilizadas na caracterização dos compostos fenólicos

- Determinação do teor em fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

O ensaio Folin-Ciocalteu foi descrito pela primeira vez em 1965 por Singleton e Rossi, e desde então tem sido amplamente utilizado pela maioria dos investigadores. Baseia-se na redução, a pH alcalino, do reagente Folin-Ciocalteu, efetuada pelos compostos fenólicos da amostra e que origina o aparecimento de um produto azul com um máximo de absorção a 765 nm, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor em compostos fenólicos (Singleton et al., 1999; Huang et al., 2005). Este método é simples, sensível e preciso mas que pode sofrer interferências de outros componentes da amostra que possam igualmente reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu como, por exemplo, adenina, adenosina, alanina, ácido aminobenzóico, ácido ascórbico, benzaldeído, cisteína, creatinina, histamina, histidina, índole, frutose, sacarose, sulfito de sódio, sulfato de ferro e outros (Prior et al., 2005).

- Determinação do teor em antocianinas totais pelo método do bissulfito

O bissulfito é o composto responsável pela reação que caracteriza este método, aqui o anião bissulfito (HSO_3^-) liga-se ao carbono 4 do catião flavílio de um modo reversível, originando um aduto incolor. O bissulfito pode também ligar-se à posição 2 da antocianina resultando igualmente numa estrutura sem cor, a leitura da absorvância é feita aos 520 nm. As constantes de equilíbrio desta reação são elevadas, indicando que quantidades pequenas de bissulfito podem descorar grandes quantidades de antocianinas (Sommers e Evans, 1976).

- Determinação do teor em flavonóides totais a partir do cloreto de alumínio

Vennat et al. (1992) desenvolveram um método para determinar o teor total de flavonóides utilizando o cloreto de alumínio. O catião alumínio em meio de metanol forma complexos estáveis com os flavonóides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Desta forma, é possível determinar o teor em flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. Nestas condições, o complexo flavonóide-Al absorve num comprimento de onda de 510 nm. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se desta forma interferências nas medidas de absorvância (Woisky e Salatino, 1998).

- Determinação do teor em taninos hidrolisáveis a partir do iodeto de potássio

A reação do iodeto de potássio (KIO_3) com os taninos hidrolisáveis foi desenvolvida por Bate-Smith em 1977. Neste método, na presença de acetona ou metanol, o iodeto de potássio vai reagir com os taninos, originando compostos que absorvem a um comprimento de onda entre 500 e 550 nm. A reação entre KIO_3 e os taninos é uma oxidação, onde há a formação de cromóforos de cor vermelha, pouco estáveis, formados numa etapa inicial da reação. Numa segunda reação, mais lenta, ocorrem novamente oxidações, produzindo cromóforos de cor amarela, causando alguma interferência no método, daí ser essencial que a leitura seja feita antes do aparecimento da cor amarela. O tempo de reação para alcançar a cor máxima com os diferentes taninos é muito variável. Os diferentes taninos produzem cromóforos com diferentes propriedades espectrais. Além disso, em algumas situações pode ocorrer precipitação de compostos durante a reação com o KIO_3 (Paul et al., 2002; Willis et al., 1998).

- Determinação do teor em procianidinas/taninos condensados a partir da vanilina

O método envolve a reação do aldeído aromático, a vanilina, com o anel meta substituído por grupos hidroxilo dos flavanóis produzindo um aduto vermelho. A vanilina reage somente com flavanóis livres, ou com a unidade terminal das proantocianidinas. O sucesso deste ensaio depende

do tipo do solvente usado, da concentração e natureza do ácido, do tempo da reação, temperatura e concentração da vanilina. Os maiores problemas neste método são a falta de reprodutibilidade e a reatividade dos polímeros nos taninos, o que leva a uma reação não específica entre a vanilina e os mesmos. Estas estruturas são complexas e muito variáveis, fazendo com que qualquer flavonóide que tenha estas características reaja no ensaio. Portanto a reatividade à vanilina não é prova suficiente para afirmar a presença de taninos condensados, uma vez que a técnica tem muitos interferentes (Sun et al., 1998). Esta reação é bastante sensível à água, apenas uma pequena quantidade de água na amostra provoca a diminuição substancialmente da cor. Se a água tiver obrigatoriamente de estar presente nas amostras a serem analisadas, terá de ser adicionada na mesma quantidade aos padrões (Sun et al., 1998).

- Análise por HPLC-DAD-ED

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem vindo a ser o método de eleição para a análise dos compostos fenólicos, devido à sua versatilidade, sensibilidade, precisão e exatidão. Esta técnica consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. De acordo com a natureza das interações existem diferentes modos de separação, o utilizado neste trabalho foi a cromatografia de fase reversa, onde a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada em HPLC, uma vez que permite o uso de fases móveis aquosas. A afinidade dos compostos com a coluna cromatográfica é responsável pela separação e pelo tempo de retenção destes compostos. A diferença de afinidades entre estes compostos e a coluna cromatográfica determina a eficiência da separação dos vários constituintes das amostras, mesmo quando complexas (Miniati, 2007; Quian et al., 2007).

Nesta técnica e para o estudo deste tipo de compostos com alguma polaridade é comum o uso de colunas de fase reversa do tipo C18, e um sistema binário de solventes, como uma solução aquosa de ácido fosfórico ou fórmico e um solvente orgânico como o acetonitrilo ou metanol. As duplas ligações C=C dos compostos fenólicos conferem-lhes propriedades cromóforas, o que permite a combinação do HPLC com detetores de ultravioleta/luz visível (UV/VIS), razão pela qual são frequentemente utilizados na análise qualitativa e quantitativa de amostras contendo compostos fenólicos (Markham e Bloor, 1998). Os detetores de fotodíodos permitem fazer a aquisição espectral dos compostos eluídos, tornando este tipo de detetor útil na identificação e monitorização da pureza dos compostos. Os espectros obtidos são então comparados com os de compostos padrão. A deteção por UV-vis é uma ferramenta crucial e de confiança na análise destes compostos em plantas (Miniati, 2007; Nikolin et al., 2004).

Quase todos os compostos fenólicos têm um pico máximo de absorção no intervalo 270-280 nm. No entanto, outros comprimentos de onda são frequentemente usados para uma deteção mais seletiva de certas classes, nomeadamente os ácidos hidroxicinâmicos a 320 nm, os flavonóides a 360 nm e a 520 nm para as antocianinas (Miniati, 2007; Valente, et al., 2010).

- Análise por LC-ESI-MS/MS

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica que permite a identificação e quantificação numa amostra complexa através da deteção do íão molecular e dos respetivos fragmentos. É a técnica que fornece as melhores informações relativas à estrutura do composto, apresenta uma elevada sensibilidade, permitindo a identificação estrutural de substâncias encontradas em quantidades muito pequenas (Mendham, et al., 2002; Stobiecki, et al., 2000).

À saída da coluna do LC está ligada o espectrómetro de massa. A entrada da amostra vai ocorrer na fonte de ionização que pode ser de diferentes tipos. No caso da fonte de electrospray (ESI) ela é formada por um tubo capilar de metal circundado por um fluxo de gás nebulizador (geralmente azoto). Aplica-se uma diferença de potencial de alguns milhares de volts entre a ponta do tubo de metal e o cone de amostragem, criando um *spray* formado por gotículas do composto na fase móvel e o gás nebulizador. O solvente é então evaporado, e à medida que ocorre a

dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido sucessivamente, até que os íons do composto evaporem e sejam direcionados para o cone de amostragem, e de seguida para o analisador, onde ocorre a separação dos íons de acordo com a relação entre as suas massas e cargas, ou seja, razão m/z (Mendham, et al., 2002; Niwa, et al., 1995).

Nestes equipamentos podem ser utilizados diferentes analisadores, sendo que um dos mais utilizados é do tipo triplo quadrupolo. Este analisador é robusto, de fácil construção e de elevada sensibilidade. Cada quadrupolo é constituído por quatro cilindros metálicos dispostos em paralelo, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons, mas sim como célula de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão (DIC) com um gás inerte, e também funciona como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo.

- Determinação da atividade antioxidante

O ensaio ORAC permite determinar a capacidade da amostra em estudo para sequestrar radicais peróxido ($ROO\cdot$) gerados pela decomposição térmica (a $37^{\circ}C$) do 2,2'-Azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorato (AAPH), através da determinação da inibição da oxidação da fluoresceína induzida por estes radicais (Dunlap et al, 2003). O radical peróxido oxida a fluoresceína originando produtos não fluorescentes. Desta forma a incubação da fluoresceína na presença de uma fonte de radicais peróxido leva a uma diminuição imediata da fluorescência. Quando esta incubação se processa na presença de um antioxidante verifica-se um período de latência antes de se iniciar essa diminuição, sendo que esse período de latência é tanto maior quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra (Ou *et al.*, 2001).

O ensaio HORAC é um método direto baseado na oxidação da fluoresceína (FL) por radicais hidroxilos pela via clássica de transferência do átomo de hidrogénio. Os radicais livres são gerados pelo peróxido de hidrogénio que provocam a fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo e os antioxidantes presentes nas amostras bloqueiam a oxidação da fluoresceína. A área abaixo da curva de decadência da fluorescência é usada para quantificar a atividade antioxidante total do grupo hidroxilo numa amostra em comparação com a curva padrão do ácido cafeico. O método utilizado foi desenvolvido de acordo com Ou et al. (2002), utilizando como fluoróforo a fluoresceína, que na sua forma oxidada se torna incolor. Tal como no método ORAC, é possível acompanhar a cinética da reação medindo a redução da fluorescência da solução e dessa forma, quantificar a capacidade protetora dos antioxidantes testados. Por otimização do método (Serra et al., 2008), selecionou-se, o ácido cafeico como composto fenólico padrão, pelo que, em cada ensaio, é necessário efetuar uma reta de calibração com soluções deste composto.

5. Mirtilo

O mirtilo pertence à família das *Ericáceas*, subfamília *Vaccinoideae* e género *Vaccinium*. É um fruto de clima temperado, que apresenta grande importância comercial, é nativo de algumas regiões da Europa e da América do Norte, sendo que a produção mundial concentra-se principalmente nos Estados Unidos e Canadá (Kalt et al., 2001; Silva et al., 2008; Strik, 2005; Pagot et al., 2003). No entanto, o cultivo do mirtilo (*Vaccinium* spp.) está em expansão em alguns países da América do Sul, como o Brasil, Chile, Argentina e Uruguai (Bañados, 2006). O consumo tem vindo a aumentar nos últimos anos, e a procura por parte dos países europeus, nomeadamente durante a época oposta à produção no continente Americano, levou ao aumento da produção por parte destes países (Antunes et al., 2007).

O mirtilo é utilizado na alimentação humana há vários séculos, existem referências que datam o seu consumo no século XVIII, na forma de fruto fresco e seco, com utilização também para fins medicinais (Sousa et al., 2007). Atualmente este fruto apresenta um elevado consumo na Europa e América do Norte, devido às propriedades benéficas que apresenta. A sua disponibilidade,

versatilidade e variedade, permitem que seja incorporado numa ampla variedade de formulações alimentares (Payne et al., 2005).

O consumo de mirtilos é favorecido pela sua cor, resultante do elevado conteúdo de pigmentos naturais, principalmente compostos fenólicos de natureza antociânica (Kader et al., 1996).

Em Portugal, de acordo com dados da FAO, obtidos em 2011, a produção de mirtilos apresentou uma média anual de 172 toneladas, entre 2004 e 2009, o que constitui um valor pequeno em comparação com o maior produtor da Europa, a Polónia, que teve uma produção média anual de 8,424 toneladas no mesmo período. A exportação de mirtilo em Portugal representa um valor médio anual de 753.721,00 € em igual período. A principal espécie de mirtilos cultivada em Portugal é o *Vaccinium corymbosum*, contudo existem espécies que nascem de forma selvagem, *Vaccinium myrtillus*, principalmente no norte do país. A composição destes frutos é idêntica à verificada nos mirtilos produzidos noutros países, não existindo diferenças significativas (Sousa et al., 2007).

5.1. Espécies e variedades de mirtilo

Existem cerca de 450 espécies de mirtilo diferentes. A maioria encontra-se nos trópicos em zonas elevadas, mas também há espécies que se adaptam em regiões temperadas. As variedades mais relevantes do ponto de vista económico são sobretudo “Northern e Southern Highbush” (*Vaccinium corymbosum*), “Lowbush” (*Vaccinium angustifolium*), “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e o mirtilo europeu (*Vaccinium myrtillus*). A espécie *Vaccinium corymbosum*, estudada neste trabalho, apresenta-se na forma de arbustos com tamanhos médios e formas variadas, é proveniente principalmente da América do Norte, mas já se encontra amplamente distribuído pelo planeta (Hui et al., 2006; Pagot, 2009; Rieger, 2006; Rowland e Hammerschlag, 2005).

As plantas das variedades “Highbush” (“Northern” e “Southern”) são as que apresentam maior interesse para as condições climáticas de Portugal. Apresentam-se sob a forma de arbustos sazonais que podem atingir os 1,8 a 2,1 metros de altura em cultivo e atingem uma produção máxima em cerca de 4 anos, começando a declinar em seguida. As folhas são pequenas (2,5 a 5,1 cm) ovais ou elípticas com pontas aguçadas. O fruto destas variedades tem cor azul escura apresentando uma qualidade frutífera boa a excelente. Estas variedades demoram entre 45 a 75 dias desde a floração até à maturidade do fruto. Na zona centro/norte de Portugal a variedade que apresentam melhor desempenho é a Northern Highbush, enquanto que a sul do Tejo, é a variedade Southern Highbush por necessitarem de menos horas de frio. A produção de mirtilos pode decorrer durante os meses de Abril a Agosto combinando-se a cultura ao ar livre e a cultura protegida, desde que se proceda a uma escolha criteriosa das cultivares (Pagot, 2009; Rieger, 2006; Rowland e Hammerschlag, 2005; Sousa et al., 2007).

5.2. Morfologia do fruto

O fruto baciforme e globoso é sumarento e tem um sabor agridoce (Silveira et al., 2007). A baga apresenta no interior muitas sementes que contribuem para um sabor menos acentuado e conferem um certo grau de arenosidade. A cor do mirtilo é influenciada pela presença de pruína, cera epicuticular, que produz o efeito glauco responsável pela cor azul típica dos mirtilos. A baga apresenta ainda uma cicatriz, diametralmente oposta ao ápice, de dimensão e formato variáveis, segundo a espécie e cultivar. A cicatriz, pela sua dimensão, configuração e profundidade, pode ser um foco de contaminação, provocando perdas de humidade consideráveis e emurchecimento que conduzem a depreciação da qualidade pós-colheita (Sousa et al., 2007).

Os mirtilos destinados à comercialização em fresco devem apresentar-se com cor azul e recobertos pela cera epicuticular natural, a pruína, que constitui uma barreira importante à perda de água, impedindo o seu emurchecimento. A perda da pruína é indicação de sobrematuração ou deficiente manuseamento durante a colheita e/ou pós-colheita (Sousa et al., 2007). A dureza do epicarpo pode variar de acordo com a espécie, indicando diferenças na espessura e composição da

parede celular (Silva et al., 2005). O mirtilo é um fruto não-climatérico, uma vez que não se observam variações significativas na taxa respiratória ao longo do tempo de colheita e conservação. Isto permite que a colheita do mirtilo possa ser realizada até 1 mês, a partir da altura em que apresenta as condições ideais (Lavadinho et al., 2001).

Com o constante aumento do consumo de mirtilos frescos que se verificou nas últimas duas décadas, desenvolveram-se novas cultivares, nomeadamente a *Chanticleer*, *Duke* e *Bluegold*, de forma a obter frutos de melhor qualidade, com maior tempo de prateleira e que prolonguem a época de colheita para dar resposta às solicitações do mercado (Hancock et al., 2001; Saftner et al., 2008).

5.3. Produtos do mirtilo

O mirtilo pode ser conservado, na forma *in natura*, por algum tempo, utilizando-se métodos de conservação como a refrigeração, o congelamento, a atmosfera controlada e atmosfera modificada. Contudo, o mirtilo muitas vezes é transformado em produtos, pois mesmo com o uso de métodos de conservação que aumentem a sua vida de prateleira, não é possível dispor de frutas *in natura* durante todo o ano. Além disso, a elaboração de produtos de mirtilo aumenta o valor da fruta, visto que são utilizadas frutas de todos os tamanhos, inclusive as menores que não são bem aceites pelo consumidor para o consumo *in natura* (Connor et al., 2002; Harb e Streif, 2004; Kader, 1995; Raseira e Antunes, 2004).

O mirtilo é uma excelente matéria-prima para elaboração de diversos alimentos processados, principalmente devido a sua cor característica, que confere aos produtos uma coloração atraente para o consumidor. Contudo o mirtilo contém uma elevada percentagem de material mucilaginoso, que dificulta o seu processamento (Fraga et al., 2009).

Em países onde a cultura do mirtilo é tradicional, como nos Estados Unidos, existem inúmeros produtos à base ou adicionados de mirtilo, tais como: sumos, néctares, geleias, sorvetes, cereais, refrigerantes, pão, *toppings*, entre outros. Muitos investigadores têm realizado inúmeras pesquisas para o desenvolvimento de produtos à base de mirtilos, principalmente mantendo a sua capacidade antioxidante após o processamento. No entanto, os resultados obtidos nas pesquisas científicas, muitas vezes não são atingíveis a nível industrial. Como exemplo, Kechinski et al. (2010) avaliaram a degradação cinética das antocianinas no sumo de mirtilo e Kechinski et al. (2011) avaliaram a adição de xantana e frutose num puré de mirtilo.

5.4. Fatores indicadores da qualidade do mirtilo

Os primeiros fatores indicadores da qualidade resumem-se à aparência exterior (tamanho, forma, humidade, ausência de defeitos e sanidade), parâmetros relacionados com o grau de maturação (aroma, sabor, cor e textura) e o valor nutricional, sendo o grau de maturação no momento da colheita determinante para a qualidade do fruto (Chitarra et al., 2005; Kader, 1996; Sousa et al., 2007). Nos mirtilos destinados ao consumo em fresco, a firmeza da polpa determina a sua aceitabilidade pelo consumidor e afeta o seu período de conservação pós-colheita (Molina et al., 2008). Celulose, hemicelulose, pectina e lenhina são os principais constituintes da parede celular do fruto. Alterações na composição da parede celular e da lamela média do fruto, constituídas principalmente por pectina, são associadas a alterações da textura. A solubilização da pectina é frequentemente correlacionada com a perda de firmeza. Por outro lado, a lenhina é responsável pela rigidez e dureza da parede celular das células pétreas, as quais, dependendo do seu número e tamanho, conferem ao fruto uma textura arenosa. A quantidade de lenhina presente é uma característica da cultivar (Silva et al., 2005).

O sabor é essencial para a aceitação do fruto, e no caso do mirtilo as características sensoriais normalmente atribuídas aos compostos fenólicos são a adstringência e sabor o amargo. A adstringência está relacionada com a precipitação de proteínas salivares devido à interação com estes compostos, que provoca uma sensação de secura ao longo da superfície da língua (Naczki e

Shahidi., 2006). Os taninos são os compostos fenólicos mais adstringentes, mas alguns compostos menos complexos, tais como as catequinas e ácido p-cumárico, também causam adstringência (Huang e Zayas, 1991). O sabor amargo é conferido por um conjunto mais amplo de compostos, tais como os derivados do ácido hidroxicinâmico, a catequina, a epicatequina, a hesperidina, a naringina e algumas flavanonas glicosiladas (Drewnowski e Gomez-careros, 2000; Kallithraka et al., 1997).

A cor é um importante parâmetro de qualidade, influenciando o valor de mercado do fruto destinado ao consumo em fresco, mas também determina a conformidade dos mirtilos destinados a processamento. As antocianinas são os compostos responsáveis pela cor nestas pequenas frutas, no entanto, a cor é um atributo complexo, determinado pelo teor total em antocianinas e pela quantidade e estrutura da cera superficial, a pruína (Silva et al., 2005). Em alguns casos, pode ocorrer o escurecimento destes frutos e deve-se sobretudo à ação enzimática de polifenoloxidasas que catalisam a oxidação destes compostos, que rapidamente se condensam e formam produtos de cor castanha. Este processo ocorre durante o envelhecimento, ou como resultado de uma lesão nas frutas. Esta reação também provoca uma alteração negativa no aroma e no sabor do fruto (Shahidi e Nacz, 2004).

5.5. Composição nutricional do mirtilo

Os mirtilos apresentam um baixo teor calórico e baixo conteúdo lipídico, proteico e em sódio. Apresenta um conteúdo em água que varia entre 80,1 e 87,7%. Os sólidos solúveis representam cerca de 80% da matéria seca do fruto, são nomeadamente açúcares (glicose e frutose), fibras e minerais. Já a matéria insolúvel é constituída principalmente pela casca e sementes (Hui et al., 2006; Silveira et al., 2007; Sousa et al., 2007; Skupień, 2006).

Nestes frutos encontram-se uma grande variedade de vitaminas e minerais, são eles: vitaminas A, B, C, K e ácido fólico; os minerais cálcio, ferro, magnésio, fósforo, potássio, zinco, selénio e manganês. Encontramos ainda teores em pectinas, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, em especial de antocianinas (Hui et al., 2006; Silveira et al., 2007; Sousa et al., 2007). O teor de fibras e azoto do fruto é fortemente condicionado pela fertilização da planta e parcialmente por fatores genéticos, bioquímicos e fisiológicos das espécies (Skupień, 2006).

Tabela 2 – Valor nutricional do mirtilo (*adaptado* de USDA, 2010)

Valor nutricional por 100g de fruto	
Energia (Kcal)	57,00
Proteínas (g)	0,74
Gorduras (g)	0,33
Hidratos de carbono (g)	14,49
Fibra (g)	2,40
Água (g)	84,21
Cálcio (mg)	6,00
Ferro (mg)	0,28
Magnésio (mg)	6,00
Manganésio (mg)	0,34
Fósforo (mg)	12,00
Potássio (mg)	77,00
Selénio (mg)	0,10
Sódio (mg)	1,00
Zinco (mg)	0,16
Vitamina C (mg)	9,70
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	0,04
Niacina (mg)	0,42
Ácido pantoténico (mg)	0,12
Vitamina B6 (mg)	0,05
Folato (µg)	6,00

Vitamina A (UI)	54,00
Vitamina E (mg EAT)	0,57

EAT – Equivalentes de α -tocoferol; UI – Unidades Internacionais

O mirtilo contém ácidos orgânicos em teores elevados, sendo os mais comuns o quínico, o málico e o cítrico (Ayaz et al., 2001). Na variedade *Southern Highbush* o ácido cítrico é o mais abundante, em média cerca de 83% do total, seguindo-se o sucínico com cerca de 11%, o málico e o quínico com cerca de 2% e 5%, respetivamente (Wang et al., 2008). Enquanto que noutras espécies, o ácido quínico representa 40% dos ácidos orgânicos presentes no mirtilo (Sousa et al., 2007), o ácido málico apresenta valores entre 0,06 a 0,14 g/100 g de fruto (Rodrigues et al., 1992) e o ácido cítrico 0,4 a 0,5 g/100 g de fruto (Raseira e Antunes, 2004). Tem, igualmente, sido identificada, em diversas variedades de mirtilos, a presença de ácido ursólico e de ácido pomólico (especialmente na película do fruto) e de outros triterpenos, como a β -amirina, e ainda de esteroides como o sitosterol (Neto, 2007).

Na variedade “Southern Highbush” os açúcares frutose e glucose são predominantes, enquanto a sacarose tem um teor muito baixo (Bremer et al., 2008). O teor em sólidos solúveis no fruto, assim como a sua acidez, registam variações sazonais (Skupień, 2006) e são dependentes das técnicas de cultivo. Comparando o cultivo biológico com o tradicional obtiveram-se maiores teores de açúcar (glucose e frutose) e de ácido málico em mirtilos de cultivo biológico. No entanto, o método de cultivo não mostrou afetar a concentração de ácido cítrico (Wang et al., 2008).

5.6. Composição fenólica do mirtilo

A atividade biológica dos mirtilos é atribuída principalmente ao seu elevado teor e variedade em compostos fenólicos (Wu et al., 2004), sendo quase sempre superior à maioria das frutas (Wolfe et al., 2008). Foram identificados, tanto nos mirtilos selvagens, como nos mirtilos cultivados, diversos compostos, apresentando, de um modo geral, os mirtilos selvagens, teores, em particular antocianinas, mais elevados do que as variedades cultivadas (Giovanelli e Buratti, 2009). Dos diversos tipos de polifenóis, os mirtilos apresentam elevadas quantidades de antocianidinas (cianidina, malvidina, delphinidina, peonidina e petunidina), e flavonóis (quercetina, canferol, miricetina, etc.), principalmente na forma glicosilada, mas também flavanóis (catequina), ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, (principalmente o ácido clorogénico), estilbenos (resveratrol), e taninos (proantocianidinas, elagitaninos e galhotaninos) (Giovanelli e Buratti, 2009; Neto, 2007; Seeram et al., 2006; Skrede et al., 2000; USDA, 2011 e 2012; Wang et al., 2008; Zheng e Wang, 2003). Na tabela 3 estão descritos alguns compostos e os respetivos teores encontrados nos mirtilos.

Tabela 3 – Conteúdo de alguns flavonóides presentes no mirtilo (adaptado USDA, 2011)

Conteúdo em flavonóides mg/100 g de fruto fresco		
Classe	Flavonóide	Valores médios
Antocianidinas	Cianidina	7,10
	Delfinidina	30,91
	Malvidina	59,64
	Peonidina	15,36
	Petunidina	28,02
Flavanóis	Epicatequina	0,62
	Epigallocatequina	0,66
	Catequina	5,29
	Galocatequina	0,12
Flavonas	Luteolina	0,20
Flavonóis	Canferol	1,66
	Miricetina	1,26
	Quercetina	7,67

De entre os compostos fenólicos as antocianinas são os que se encontram em maior teor e, desta forma, são os compostos mais relevantes presentes no mirtilo (Kahkonen et al., 2003). Os

frutos da variedade *Highbush* apresentaram antocianinas mais polares e um teor de antocianinas totais superior às da variedade *Rabbiteye* (Lohachoopol et al., 2008).

A composição em compostos fenólicos nas variedades de mirtilo *Vaccinium corymbosum* e *Vaccinium myrtillus* são qualitativamente muito similares, quantitativamente já existem algumas diferenças. Já foram identificados um grande número destes compostos, nomeadamente flavonóis como a miricetina-3-O-glucuronídeo, miricetina-3-O-galactósido, miricetina-3-O-glucósido, miricetina-3-O-xilósido, laricitrina-3-O-glucuronídeo, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-glicósido, quercetina-3-O-glucuronídeo, quercetina-3-O-arabinósido, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina-3-O-xilósido, isoramnetina-3-O-galactósido, isoramnetina-3-O-glucósido, isoramnetina-3-O-xilósido, siringetina-3-O-glucósido, canferol-3-O-glucósido (Zushang, 2012); flavanóis como a catequina, epicatequina, epigallocatequina, e galocatequina; flavonas como a apigenina e luteolina; e diversas proantocianidinas, nomeadamente procianidinas do tipo B (Kaisu et al., 2008; Prior et al., 2001; Zushang, 2012). Quanto às antocianinas, já foram identificadas para estas duas variedades, aproximadamente 21 compostos, nomeadamente a cianidina-3-O-arabinósido, cianidina-3-O-galactósido, cianidina-3-O-glicósido, peonidina-acetil-3-O-glucósido, peonidina-3-O-galactósido, peonidina-3-O-glicósido, peonidina-3-O-arabinósido, delfinidina-3-O-galactósido, delfinidina-3-O-glicósido, delfinidina-3-O-arabinósido, petunidina-3-O-galactósido, petunidina-3-O-glicósido, petunidina-3-O-arabinósido, malvidina-3-O-galactósido, malvidina-3-O-glicósido, malvidina-3-O-arabinósido, entre outras (Zushang, 2012; Wu e Prior, 2005). O teor total de antocianinas é variável de acordo com a origem da amostra, no entanto, em todas as amostras, as cianidinas apresentaram os teores mais elevados e, na maioria das amostras, as malvidinas e peonidinas apresentaram os teores mais baixos (Burdulis et al., 2007; Kader et al., 1996).

Foram também identificados, pelo menos, 16 ácidos fenólicos em diversas cultivares de mirtilos, nomeadamente derivados do ácido hidroxibenzóico: gentísico, gálico, o-pirocatechuico, protocatechuico, salicílico, síringico, vanílico e verátrico; derivados do ácido hidroxicinâmico: cafeicocafeico, m-cumárico, o-cumárico, p-cumárico, 3,4-dimetoxicinâmico, ferúlico, hidroxicafeico e sinápico (Kalt e McDonald, 1996; Mattila et al., 2006; Sellappan et al., 2002; Zadernowski et al. 2005). Na tabela 4 estão descritos outros ácidos hidroxicinâmicos já descritos nos mirtilos.

Tabela 4 – Derivados do ácido hidroxicinâmico presentes no mirtilo (*adaptado* de Belitz e Grosch, 2009)

Composto	mg/100g de fruto fresco
Ácidos cafeolquínicos	0,186 – 0,208
Ácidos p-cumaroilquínicos	0,2 – 0,5
Ácidos feruiloilquínicos	0,8
Ácido cafeico-4-O-glucósido	0,3
Ácido p-cumárico-O-glucósido	0,3 – 1,5
Ácido ferúlico-3-O-glucósido	0,8 – 1

5.7. Fatores que afetam a composição do mirtilo

A composição do mirtilo é condicionada por fatores endógenos, isto é, fatores genéticos característicos das diferentes cultivares, e fatores exógenos, como os ambientais: clima, temperatura e intensidade da radiação ultravioleta; tipo de solo, condições de cultivo: grau de fertilização e disponibilidade em água; maturação e condições de armazenamento: temperatura e humidade relativa. A perda de água nos frutos conduz à redução de volume e perda de massa, porém o elevado teor de humidade torna-os, geralmente, mais suscetíveis à deterioração, aumentando a possibilidade de contaminação microbológica (Giovanelli & Buratti, 2009; Hakkinen et al., 2000; Sousa et al., 2007). Desta forma, é possível verificar que para uma mesma variedade, há variações no perfil de compostos antioxidantes entre locais de produção ou entre épocas de produção (Kader et al., 1996).

Os fatores genéticos variam com a espécie, com as características do solo, práticas de cultivo (densidade de plantação, fertilização, irrigação e tratamentos anti pragas), condições climáticas, exposição solar, hidratação, grau de maturação na data de colheita e método de colheita (Fonseca

et al., 2007; Hakkinen et al., 2000; Skupień, 2006). Exemplo disso é a variação do conteúdo em fenóis totais e antocianinas presente entre diferentes variedades dentro da mesma espécie (You et al., 2011). Na espécie *V. myrtillus* (mirtilo europeu) o teor em fenóis totais foi determinado com sendo duas a três vezes superior ao presente em variedades de *V. corymbosum*. Os mirtilos selvagens apresentam atividade antioxidante aproximadamente igual ao dobro da dos mirtilos cultivados (Giovannelli et al., 2009). No *V. myrtillus* a polpa é escura, enquanto que no *V. corymbosum* a polpa é esbranquiçada., esta particularidade pode indicar que o PH dos frutos é diferente, conferindo cor às antocianinas (Riihinen et al., 2008).

Quanto às condições de cultura e métodos de produção, verificou-se que os mirtilos da mesma variedade, quando cultivados nas mesmas condições de solo e clima em agricultura biológica apresentavam quantidades significativamente maiores de fenóis totais e de antocianinas e uma maior ação antioxidante, medida pelo ensaio ORAC, do que quando cultivados em agricultura convencional. Isto ocorre devido à influência que os químicos, utilizados na agricultura convencional, exercem na produção e no comportamento dos fenólicos na planta (Wang et al., 2008).

Relativamente ao clima, os frutos produzidos em zonas de verões quentes e secos têm uma concentração mais elevada de açúcares, são mais aromáticos e de coloração mais intensa, do que os que crescem em regiões mais amenas e húmidas (Rieger, 2006).

Durante a fase de amadurecimento, a concentração em antocianinas e fenóis totais também sofre uma variação perceptível através das mudanças de cor dos frutos que refletem um aumento dos teores de antocianinas. À medida que o fruto amadurece a concentração em flavonóides e taninos diminui, e aumenta a concentração em antocianinas (Burdulis et al., 2007). Prior e colaboradores (1998) verificaram que mirtilos colhidos logo após terem adquirido a cor azulada e outros colhidos 49 dias depois com maior grau de maturação, apresentavam um aumento nos valores de ORAC, antocianinas e fenóis totais de 224%, 261% e 169%, respetivamente. Kalt e colaboradores (2003) verificaram em cultivares *Highbush* um aumento substancial do teor em antocianinas durante a fase de maturação. Verificaram uma diminuição no teor de fenóis totais e um aumento no teor de antocianinas mantendo-se, no entanto, constante a capacidade antioxidante, sugerindo que tanto as antocianinas como os outros fenólicos contribuem para a capacidade antioxidante nas diferentes fases de maturação (Kalt et al., 2003; Kalt, 2005). Castrejón et al. (2008) observaram uma diminuição dos ácidos hidroxicinâmicos e flavonóis, aumento de antocianinas, e diminuição da atividade antioxidante ao longo de todas as fases do amadurecimento.

Nas variedades de mirtilo *Lowbush* e *Highbush* as antocianinas encontram-se apenas na película, e as procianidinas na polpa do fruto. Quando o fruto aumenta de tamanho, a polpa também aumenta, mas este não é significativo na película. Com isto, o aumento do fruto leva ao aumento do teor de procianidinas, não influenciando o teor de antocianinas (Harris et al., 2007; Kalt et al., 2001).

5.8. Atividade biológica do mirtilo

De todos os frutos, o mirtilo é um dos que apresentam maior atividade biológica e efeitos benéficos na saúde devido ao teor elevado de compostos fenólicos. O interesse nestes compostos advém de vários estudos que sugerem que uma dieta rica em frutas, vegetais, cereais integrais e leguminosas, contendo polifenóis ou extratos preparados a partir deles, possa trazer benefícios à saúde e diminuir o risco de doenças crónicas degenerativas (Prior et al., 2006). A importância da nutrição humana geralmente está relacionada com a promoção de saúde e a possível prevenção de algumas doenças, como está comprovada na dieta mediterrânica (Gibney et al., 2006; Phapale e Misra-Thakur, 2010). Desta forma, é possível que, estes compostos acabem por ser essenciais aumentando a qualidade de vida durante o envelhecimento (Holst e Williamson, 2008).

Além da reconhecida capacidade antioxidante, também são atribuídas atividades biológicas específicas a estes compostos (tabela 5), que influenciam a expressão genética, uma vez que têm

a capacidade de interagir com o ADN, a sinalização e a adesão celular (Abalea et al., 1999; Saura-Calixto et al., 2007).

Tabela 5 – Efeitos benéficos na saúde dos compostos fenólicos presentes no mirtilo

Ações dos fenólicos	Compostos responsáveis	Autores
<p>Antioxidante</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓radicais livres • ↓lipoperoxidação 	<p>A maioria dos compostos fenólicos com grupos hidroxilo nas posições 3 e 5 – ácidos fenólicos, antocianinas, flavanóis e flavonóis</p>	<p>Bornsek et al., 2012 Duffy et al., 2008 Eichholz et al., 2011 Faria et al., 2005 Heinonen et al., 1998 Kalt et al., 2000 Kalt et al., 2008 Kay et al., 2002 Koca e Karadeniz, 2009 Molan et al., 2008 Pedersen et al., 2000 Prior et al., 1998; 2003; 2009; 2010 Seeram et al., 2001 Serafini et al., 2009 Wang et al., 1996; 2000; 2003; 2005; 2008a; 2012</p>
<p>Anti-inflamatória</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ COX, LOX, MPO • ↓ xantina oxidase 	<p>Quercetina, apigenina, catequina, hesperidina, rutina, luteolina, canferol, miricetina, ácido cafeico, entre outros</p>	<p>Cao et al., 1997 Coutinho et al., 2009 Guardia et al., 2001 Kylli et al., 2011 Marchand et al., 2002 Martin et al., 2004 Miller et al., 1996 Proença da Cunha et al., 2007 Seeram et al., 2001 Sousa et al., 2007 Tapas et al., 2008</p>
<p>Anticancerígeno</p> <p>1. Antimutagénico ↓ danos DNA ↓ prostaglandina sintetase ↓ lipoxigenase ↓ cicloxigenase</p> <p>2. Antitumoral ↓ angiogénese</p> <p>3. Antiproliferativo ↓ proliferação células tumorais ↑ renovação celular ↑ apoptose das células tumorais</p>	<p>Quercetina, canferol, apigenina, miricetina, catequinas, elagitaninos, antocianinas, resveratrol, os ácidos elágico e cafeico, entre outros</p>	<p>Boivin et al., 2007 Bomser et al., 1996 Del Bo et al., 2013 Duthie, 2007 Ferguson, 2004 Flis et al., 2012 Katsube et al., 2002 Kraft et al., 2005 Madhavi et al., 1998 Neto, 2007 Nichenametla et al., 2006 Ramos, 2007 Seeram et al., 2006 Stull et al., 2010 Wang et al., 2000a Yi et al., 2005 e 2006 Zhang et al., 2005</p>
<p>Antimicrobiana</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antibacteriana • Antiviral • Antifungica 	<p>Quercetina, naringina, rutina, apigenina, quercetrina, canferol, epicatequina, ácido cafeico, entre outros</p>	<p>Anthony et al., 2007 Chatterjee et al., 2004 Cushnie et al., 2005 Lacombe et al., 2012 Kylli et al., 2011 Puupponen-Pimia et al., 2001</p>
<p>Hepatoprotetora</p>	<p>Quercetina, ácido cafeico, rutina</p>	<p>Gulati et al., 1995 Oh et al., 2004</p>
<p>Neuroprotetora (células cerebrais)</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓Radicais livres • ↓Stress oxidativo <p>Doenças neurodegenerativas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alzheimer • Parkinson • Esclerose lateral 	<p>Ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas e alguns flavonóis, entre outros</p>	<p>Casadesus et al., 2004 Galli et al., 1996 Joseph et al., 1999; 2005 Knekt et al., 2002 Lau et al., 2005 Neto, 2007 Youdim et al., 2000; 2000^a; 2003; 2004 Saija et al., 1999</p>

<p>Cardioprotetora</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Antiplaquetária 2. ↑ aumento da resistência capilar 3. ↓ permeabilidade das membranas 4. ↓ doenças coronárias <p>Cardiotônica</p> <p>↓ Doenças cardiovasculares</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aterosclerose • Enfarte do miocárdio • Insuficiência cardíaca • Arritmia • Hipertensão 	<p>Apigenina, canferol, quercetina, rutina, ácido cafeico, entre outros</p>	<p>Bagchi et al., 2003 Knekt et al., 2002 Mullen et al., 2002 Neto, 2007 Rouanet et al., 2010 Youdim et al., 2000; 2000^a Wang et al., 2002</p>
<p>Radioprotetora</p> <ul style="list-style-type: none"> • UV 	<p>Quercetina, entre outros</p>	<p>Arora et al., 2005</p>
<p>Sida (↓ evolução da doença)</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ protease HIV-1 	<p>Flavonóis, taninos, entre outros</p>	<p>Xu et al., 2000</p>
<p>↓ Sintomas da diabetes <i>metillus</i> (tipo II)</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ α-glucosidase 	<p>Quercetina, entre outros</p>	<p>Bravetti et al., 1989 Cignarella et al., 1996 Knekt et al., 2002 Martineau et al., 2006 Tsuda et al., 2006 Sriram et al., 2011 Stull et al., 2010 Vuong et al., 2009 Wan et al., 2012 Wang et al., 2012 Zafra-Stone et al., 2007</p>
<p>↓ Obesidade</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ degradação das gorduras • ↓ lipase pancreática 	<p>Alguns flavonóis, como a quercetina, entre outros</p>	<p>McDougall et al., 2009 Molan et al., 2008 Prior, et al., 2010 Vuong et al., 2009</p>
<p>↑ Memória cognitiva ↓ Envelhecimento ↑ Desempenho cognitivo</p>	<p>Antocianinas, flavonóis, entre outros</p>	<p>Carlsen et al., 2003 Jung et al., 2010 Ramirez et al., 2005</p>
<p>↑ Coordenação motora</p>	<p>Antocianinas e alguns flavonóis</p>	<p>Ramirez et al., 2005</p>
<p>Melhoramento da visão</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ Cataratas • ↓ Glaucomas 	<p>Antocianinas e alguns flavonóis</p>	<p>Burdulis et al., 2007 Fachinello et al., 2008 Knekt et al., 2002 Skrede et al., 2000 Yamakoshi et al., 2002</p>
<p>↓ Doenças gastrointestinais</p> <ul style="list-style-type: none"> • úlceras 	<p>Canferol, catequina, quercetina, entre outros</p>	<p>Narayana et al., 2001 Tapas et al., 2008</p>
<p>↓ Doenças reumáticas: Artrite reumatóide</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ perda óssea • ↑ mineralização óssea 	<p>Antocianinas e alguns flavonóides</p>	<p>Guardia et al., 2001 Kang et al., 2009 Knekt et al., 2002</p>
<p>Antitrombótica</p>	<p>Quercetina, rutina, entre outros</p>	<p>Narayana et al., 2001</p>
<p>Tratamento de alergias</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ sintomas 	<p>Quercetina, rutina, entre outros</p>	<p>Narayana et al., 2001 Maher et al., 2006</p>
<p>Tratamento da depressão</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ sintomas 	<p>Naringenina e alguns flavonóides</p>	<p>Fernandez et al., 2006 Yi et al., 2010</p>
<p>↓ angiogênese (crescimento de novos vasos sanguíneos)</p>	<p>Ácido ferúlico, catequina, antocianinas e alguns flavonóis</p>	<p>Bagchi et al., 2004 Nguyen, 1997 Roy et al., 2002</p>

De todos os compostos presentes no mirtilo, os fenólicos são os que merecem maior consideração, devido à sua atividade antioxidante (Sellappan et al., 2002). A contribuição individual de cada um desses compostos na ação antioxidante do mirtilo depende da estrutura de cada um deles e da concentração a que se encontram (Zheng e Wang, 2003). Estes efeitos benéficos podem resultar da ação isolada dos compostos, de grupos específicos ou de efeitos de sinergia entre eles

(Neto, 2007). De entre os frutos e vegetais, os mirtilos são dos que apresentam maior capacidade para sequestrar o radical peróxido, medida através do ensaio ORAC. A atividade antioxidante dos mirtilos parece estar mais diretamente correlacionada com a concentração de fenóis totais do que apenas com a sua concentração em antocianinas, embora estas também contribuam para as propriedades antioxidantes dos mirtilos (Giovanelli e Buratti 2009; Moyer et al., 2002; Prior et al., 1998; Zheng e Wang, 2003). Mas Sellappan et al. (2002) afirma que a combinação das 11 antocianinas que estão presentes no mirtilo corresponde a 56,3% do valor total da capacidade antioxidante.

A diminuição do risco de aparecimento de doenças cardiovasculares, por ação dos compostos fenólicos presentes no mirtilo, deve-se: à redução da fração lipoproteica de baixa densidade (LDL) e do colesterol, à inibição da peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade, e à influência destes compostos na ação da enzima óxido nítrico sintetase. Um dos possíveis mecanismos que leva a esta diminuição envolve a ligação desta molécula aos ácidos biliares com uma consequente estimulação da sua excreção, da mesma forma que as fibras alimentares e outros fitonutrientes contribuem para baixar os níveis de colesterol por estimularem a excreção de ácidos biliares e, consequentemente, estimularem a sua síntese hepática a partir do colesterol (Bagchi et al., 2003; Heim et al., 2002; Morton et al., 2000; Mullen et al., 2002; 2002a; Neto, 2007; Park et al., 2000; Youdim et al., 2000; 2000^a; Wang e Mazza, 2002).

A proteção, exercida pelos compostos fenólicos presentes no mirtilo, contra a oxidação do ADN pode estar relacionada com uma possível estabilização genómica e proteção contra efeitos cancerígenos. As proteínas oxidadas podem formar ligações cruzadas com o ADN, oxidando as bases nucleótidas, causando mutações no ADN. Este é menos suscetível ao ataque oxidativo e apresentam amplos mecanismos de reparo endógenos (Duthie et al., 2007; Hu e Kitts, 2001; Peoples e Karnes, 2005). Alguns polifenóis podem também induzir as enzimas antioxidantes ou enzimas de conjugação, como a glutatona-S-transferase, responsáveis pela desintoxicação do corpo, levando, desta forma, a um aumento da excreção de espécies oxidantes (Smith et al., 1994). Podem também inibir enzimas geradoras de espécies reativas de oxigénio tais como, os citocromos P450, as ciclooxigenases ou lipoxigenases, e quelar iões metálicos responsáveis pela produção do radical hidróxido (Cao et al., 1997; Ferguson, 2001; Heim et al., 2002; Scalbert et al., 2005).

Os extratos de mirtilo são utilizados na produção de centenas de produtos farmacêuticos (Burdulis et al., 2007). Estes extratos exercem efeitos sobre a atividade dos recetores muscarínicos-colinérgicos. Além disso, esta atividade está vinculada a canais iónicos ligante-dependente pela via de ativação do adenosinamono-fosfato cíclico (AMPC), e das proteinocinases A (PKA) e C (PKC), proteinocinases ativadas por mitógenos (MAPK), e a transcrição génica, bem como na síntese de novas proteínas, responsáveis por alterações fenotípicas que contribuirão para amplificação da resposta (Joseph et al., 2005; Duffy et al., 2008).

Dentro dos benefícios para a visão que são atribuídos aos mirtilos encontram-se o melhoramento da visão noturna, o aumento da capacidade de leitura e de focagem, o aumento da circulação sanguínea ao nível da retina, a redução da degeneração macular, a redução da retinopatia diabética e prevenção de glaucoma, retinite pigmentosa e cataratas. Estes benefícios parecem estar associados não só com os compostos fenólicos, em particular com as antocianinas, mas também com os carotenoides presentes nas espécies *Vaccinium* (Burdulis et al., 2007; Fachinello et al., 2008; Skrede et al., 2000; Zafra-Stone et al., 2007).

Os extratos de mirtilo aumentam a libertação de dopamina no cérebro, o que melhora os processos de comunicação entre os neurónios, melhorando as funções cognitivas. Verificou-se também o aumento das defesas antioxidantes do cérebro e do músculo-esquelético, retardando o envelhecimento (Carlsen et al., 2003; Jung et al., 2010; Ramirez et al., 2005; Zafra-Stone et al., 2007).

As folhas e frutos de mirtilo são utilizados no tratamento da diabetes, uma vez que reduzem os níveis de glicose no sangue, aumentam a sensibilidade à insulina, aumentam a absorção de cálcio, inibe a aldose redutase e têm a capacidade de regenerar os ilhéus pancreáticos (Bravetti et al., 1989; Cignarella et al., 1996; Knekt et al., 2002; Martineau et al., 2006; Tsuda et al., 2006; Sriram et al., 2011; Stull et al., 2010; Vuong et al., 2009; Wan et al., 2012; Zafra-Stone et al., 2007).

A atividade antimicrobiana deve-se principalmente aos taninos condensados, proantocianidinas, e antocianinas. Estes têm-se revelado eficazes no tratamento de infecções do trato urinário, ao inibirem a aderência das bactérias por elas responsáveis (Anthony et al., 2007; Cushnie et al., 2005; Lacombe et al., 2012; Kylli et al., 2011; Puupponen-Pimia et al., 2001). *In vitro*, o extrato de mirtilo inibiu o crescimento da bactéria *Helicobacter pylori*, conhecida como um fator de risco associado ao surgimento de algumas doenças gastrointestinais, incluindo úlceras e cancro no estômago (Chatterjee et al., 2004).

Estudos realizados com voluntários humanos mostraram que o consumo de mirtilos leva a um aumento da capacidade antioxidante do plasma (Pedersen et al., 2000; Ruel et al., 2005). Smith et al. (2000), utilizando a tirosina como modelo da oxidação de proteínas, ou o ácido linoleico como modelo da oxidação de lípidos, verificou-se que os extratos de mirtilo apresentam a capacidade de inibir a oxidação destas moléculas na presença de ROS.

Quanto à ação anticancerígena, o seu mecanismo não está ainda totalmente esclarecido, pensando-se que a sua capacidade de inibição de tumores resulte de uma sinergia entre os vários compostos presentes no fruto, incluindo flavonóis, principalmente a quercetina, mas também proantocianidinas, antocianinas, resveratrol, ácido ursólico, entre outros. Alguns estudos realizados *in vitro* sugerem que o mecanismo de ação inclua, entre outros, a indução de apoptose em células neoplásicas, redução da formação de metástases pela inibição de metaloproteínas, inibição da atividade da enzima ornitina descarboxilase (responsável pela síntese de poliaminas que favorecem a proliferação celular), inibição de angiogénese (formação/crescimento de novos vasos sanguíneos que vão induzir o crescimento dos tumores), inibição de processos inflamatórios, e indução de enzimas, direta ou indiretamente, envolvidas na destoxificação de vários cancerígenos como, por exemplo, a γ -glutamylcisteina sintetase, envolvida na biossíntese da glutatona, ou a quinona redutase, que converte as quinonas em hidroquinonas, quebrando desta forma os ciclos redox, responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigénio. Esta ação estende-se a diferentes zonas do corpo, nomeadamente ao estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central (Boivin et al., 2007; Bomser et al., 1996; Cuendet et al., 2006; Del Bo et al., 2013; Duthie et al., 2007; Ferguson et al., 2004; Flis et al., 2012; Katsube et al., 2002; Kraft et al., 2005; Madhavi et al., 1998; Neto, 2007; Nichenametla et al., 2006; Ramos, 2007; Seeram et al., 2006; Stull et al., 2010; Wang et al. 2000a; Yi et al., 2005 e 2006; Zhang et al., 2005).

Os mirtilos são potentes inibidores da atividade inflamatória devido, entre outros mecanismos, à inibição das enzimas envolvidas na síntese de COX, LOX e MPO (Cao et al., 1997; Coutinho et al., 2009; Guardia et al., 2001; Kylli et al., 2011; Marchand et al., 2002; Martin et al., 2004; Miller et al., 1996; Proença da Cunha et al., 2007; Seeram et al., 2001; Sousa et al., 2007; Tapas et al., 2008). A ação anti-inflamatória dos compostos fenólicos presentes no mirtilo irá ser abordada em pormenor mais à frente nesta introdução.

A extrapolação dos resultados obtidos com os polifenóis em ensaio *in vitro* para a realidade *in vivo* tem que ser efetuada com prudência, uma vez que a manutenção das propriedades verificadas *in vitro* depende de vários fatores, como, por exemplo, do facto dos compostos por elas responsáveis resistirem ao processo de digestão gastrointestinal, de serem absorvidos e não serem alterados pelas enzimas de biotransformação (Rice-Evans et al., 1996; Ferguson, 2001).

6. Inflamação

A inflamação define-se como uma resposta fisiopatológica imune e complexa, resultante da reação a uma lesão celular ou tecidual num determinado local. Resulta da resposta a um variado conjunto de agentes, nomeadamente, físicos (traumas, queimaduras por temperaturas excessivas, radiação, cirurgias), biológicos (microrganismos infecciosos e reações imunológicas), químicos (substâncias cáusticas), e isquemia (Mattson, 2003; Rang e Dale, 2003). O objetivo da inflamação é restaurar a homeostasia levando à resolução ou finalização do processo inflamatório. Porém, quando esta resposta não é modulada, ocorre exacerbação do processo inflamatório e poderá levar à perda de função (Gilroy et al., 2004). A inflamação pode apresentar-se de duas formas, inflamação aguda ou crónica.

Os mecanismos de inflamação envolvem cascatas complexas de eventos cujas respostas são iniciadas e reguladas por uma variedade de diferentes mediadores libertados por diversos tipos de células, aos quais estão atribuídas determinadas respostas inflamatórias (Calixto, 2000).

Tabela 6 – resposta inflamatória e os respetivos mediadores químicos (*adaptado* de Medzhitov, 2008)

Resposta inflamatória	Mediadores químicos
<ul style="list-style-type: none">• Inchaço• vermelhidão• calor (vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar)	<ul style="list-style-type: none">• Histamina• Prostaglandinas• Leucotrienos• Bradicinina• Fator de ativação plaquetar
<ul style="list-style-type: none">• Danos tecidulares	<ul style="list-style-type: none">• Enzimas lisossomais• Produtos libertados por neutrófilos, macrófagos e outras células inflamatórias
<ul style="list-style-type: none">• Quimiotaxia	<ul style="list-style-type: none">• Fragmentos do complemento
<ul style="list-style-type: none">• Dor	<ul style="list-style-type: none">• Prostaglandinas• Bradicinina
<ul style="list-style-type: none">• Febre	<ul style="list-style-type: none">• Interleucina-1 e interleucina-6
<ul style="list-style-type: none">• Leucócitos	<ul style="list-style-type: none">• Fator de necrose tumoral e interleucina-8

6.1. Inflamação aguda

A inflamação aguda resulta de uma resposta imediata a uma lesão. Não é específica e geralmente ocorre antes da resposta imunitária se estabelecer tendo assim como objetivo a remoção do agente infeccioso, limitando a extensão dos danos (Mattson, 2003). Os primeiros sinais são a vermelhidão, inchaço, calor, dor e poderá evoluir para a perda de função no local se o agente não for eliminado (Yoon e Bark, 2005).

Neste tipo de resposta inflamatória desencadeiam-se um conjunto de eventos complexos que envolvem extravasamento de água, sais e proteínas a partir do compartimento vascular; ativação de células endoteliais; interações de adesão entre leucócitos e o endotélio vascular; recrutamento de leucócitos; ativação de macrófagos tecidulares; ativação e agregação das plaquetas; ativação dos sistemas do complemento, da coagulação e do sistema fibrinolítico; e libertação de proteases e agentes oxidantes a partir das células fagocíticas, que podem amplificar o quadro de lesão (Ward, 2010).

Os macrófagos existentes no local iniciam a fagocitose. O primeiro efeito é o alargamento de cada das células, posteriormente muitos desses macrófagos tornam-se móveis e formam a primeira linha de defesa contra infeções durante a primeira hora. A quantidade destes macrófagos não é elevada mas têm uma importância vital (Guyton e Hall, 2006). De seguida os neutrófilos deslocam-se do compartimento vascular e infiltram-se na área lesada. O tecido inflamado provoca uma série de alterações, nomeadamente alteram a superfície interior do endotélio capilar, permitindo a adesão dos neutrófilos às paredes capilares na área inflamada (marginação); provocam alterações nas

ligações intercelulares entre as células endoteliais dos capilares e vénulas, que podem permitir a formação de aberturas suficientemente largas para os neutrófilos passarem por diapedese do sangue para o interior dos tecidos; e os produtos da inflamação levam à quimiotaxia dos neutrófilos para os tecidos lesados (Guyton e Hall, 2006).

Durante a infiltração dos neutrófilos, os monócitos presentes no sangue entram no tecido lesado e aumentam de tamanho, tornando-se macrófagos. A quantidade de monócitos presentes no sangue é baixa fazendo com que a acumulação de macrófagos na área inflamada seja mais lenta que a de neutrófilos. No entanto, mesmo depois da chegada ao local alvo, os monócitos ainda são células imaturas, precisam de 8 horas ou mais para aumentarem de tamanho e desenvolverem grandes quantidades de lisossomas, só aqui é que estas células adquirem as capacidades dos macrófagos para a fagocitose. Apenas alguns dias depois é que a disponibilidade em macrófagos é a ideal, devido ao aumento da produção de monócitos pela medula óssea (Guyton e Hall, 2006).

A manifestação da resposta inflamatória aguda pode ser atribuída a alterações vasculares imediatas, como a vasodilatação, o aumento da permeabilidade capilar, aumento de fluxo sanguíneo local e exsudação de plasma; direcionamento das células inflamatórias para o local e libertação de mediadores químicos produzidos no local da inflamação entrando posteriormente na circulação sistémica (Mattson, 2003). Os mediadores inflamatórios responsáveis por estas alterações são: óxido nítrico (NO), histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetar e substância P. Estes são responsáveis pela adesão e transmigração endotelial de leucócitos, nomeadamente os neutrófilos granulócitos, até ao local da infeção tecidular. A extravasação de neutrófilos é coordenada por moléculas de adesão intracelular, nomeadamente a ICAM-1, e moléculas de adesão vascular, nomeadamente a VCAM-1, quimiocinas, como a IL-8 e metabolitos gerados pela via do ácido araquidónico (AA) (Gosslau et al., 2011).

O AA tem um papel fundamental na inflamação, pois serve de substrato para ação de diferentes enzimas. É precursor de eicosanóides, e é um ácido gordo polinsaturado libertado maioritariamente pela membrana lipídica das células, sendo a enzima responsável por esta libertação a fosfolipase A2, apesar de também poder estar envolvida a fosfolipase C e a diacilglicerose lipase, quando estimulada por diversos fatores associados à inflamação (Kim et al., 2004; Miguel, 2010). Assim na via do ácido araquidónico a fosfolipase A2 (PLA2) fornece AA como substrato para a ciclooxigenase (COX) e para a lipoxigenase (LOX) que por sua vez originam diferentes eicosanóides, como as prostaglandinas e leucotrienos, respetivamente, desencadeando quimiotaxia e vasodilatação. A ciclooxigenase (COX) apresenta-se de duas isoformas: COX-1, a isoforma constitutiva, responsável pela produção de prostaglandinas (PGs) que controlam os processos fisiológicos normais, e COX-2, isoforma induzida, tem a sua expressão ativada nos processos inflamatórios (Gosslau et al., 2011; Miguel, 2010).

Ao nível da inflamação aguda, na via da LOX a LTA4 hidrolase assume particular importância levando à formação de um potente leucotrieno B4 (LTB4) atrator de neutrófilos e eosinófilos, estando envolvido na patogénese de diversas doenças inflamatórias humanas (Fiorucci et al., 2001; Gosslau et al., 2011). Como o tempo de meia vida dos mediadores inflamatórios e neutrófilos envolvidos na inflamação aguda é curto e como ocorre libertação de citocinas anti-inflamatórias, nomeadamente o fator transformador de crescimento β e IL-10, e mediadores como as lipoxinas, resolvinas, e protectinas, este tipo de inflamação é limitado e de curta duração (Gosslau et al., 2011).

Uma resposta inflamatória aguda resulta na eliminação do agente nocivo, seguida da fase de resolução e reparo, se a inflamação aguda falha na eliminação do agente, ou na regeneração do tecido lesado, o processo inflamatório persiste originando um estado inflamatório crónico (Medzhitov, 2008).

6.2. Inflamação crônica

Esta inflamação é causada por infecções persistentes, doenças inflamatórias imunomediadas ou exposição prolongada a reagentes tóxicos, e pode durar semanas, meses a uma vida inteira. Caracteriza-se pela infiltração de macrófagos e linfócitos, que possuem um tempo de vida de meses a anos e são responsáveis pela destruição severa dos tecidos, em vez do influxo de neutrófilos observado nas inflamações agudas, bem como pela proliferação de fibroblastos, em vez da formação de exsudatos. Neste tipo de inflamação há a formação de granuloma, necrose e fibrose, que originam danos, alguns deles irreversíveis, sendo frequente a formação de cicatrizes (Gosslau et al., 2011; Medzhitov, 2008).

Os macrófagos diferem dos monócitos não só no tempo de meia vida, mas também no processo de travessia do endotélio, o qual no caso dos macrófagos é determinado por moléculas de adesão, ICAM-1 e VCAM-1, e por quimiocinas, como a proteína quimioatratadora de monócitos-1 (MCP-1) e a proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1). Existe uma interação positiva bidirecional entre linfócitos e macrófagos que envolve diversas citocinas, como o IFN- γ , o fator de necrose tumoral (TNF- α), a IL-1 β e a IL-12, e quimiocinas, como as IL-8, MCP-1 e MIP-1, resultando assim numa resposta inflamatória prolongada (Gosslau et al., 2011).

O grau de inflamação pode ser determinado pelo balanço entre a regulação/desregulação e a inter-relação entre os mediadores inflamatórios chave. Por exemplo, citocinas como o TNF- α e a IL-1 β são essenciais para o início da resposta inflamatória, por se ligarem aos seus recetores e ativarem o NF κ B por diversas vias, controlando assim a indução de vários genes inflamatórios (Gosslau et al., 2011).

Resumidamente, a transmigração de leucócitos através do local de infecção tecidular é desencadeada pelo ICAM-1 e IL-8. A PLA2 cliva o AA dos fosfolípidos como substrato para a COX-2 e 5-LOX. A conversão de AA em prostaglandinas, tromboxanos (COX-2) e leucotrienos (5-LOX) induz quimiotaxia, vasodilatação e febre. A LTA4 hidrolase gera um potente quimioatratador: LTB₄. O TNF- α e a IL-1 β são críticos no início da resposta inflamatória por ligação aos respetivos recetores e indução da febre, vasodilatação e estimulação dos linfócitos-T ou apoptose. A expressão de genes inflamatórios é desencadeada pelo NF- κ B (locais de ligação em promotores de PLA2, COX-2, 2-LOX, iNOS, ICAM-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- β e GM-CSF) e AP-1 (locais de ligação em promotores de COX-2, iNOS, ICAM-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8). O CREB tem um papel principal como coativador transcricional do NF- κ B e AP-1. O IFN- γ ativa o NF- κ B e induz a ativação de macrófagos e apoptose mas também tem propriedade anti-inflamatórias (induz a expressão de antagonistas dos recetores de IL-1, desregula a IL-1 e IL-8). A geração de ES pró inflamatórios é mediada pela NADPH oxidase (ex.: O₂⁻) e iNOS (ex.: NO). As outras ILs têm funções pleiotrópicas como a indução de febre, estimulação de linfócitos-T, desregulação do TNF- α e IL-1 β (IL-6), indução e libertação de IFN- γ , regulação das células T (H1) (IL-12), ativação das células T e macrófagos, sinalização STAT, indução de TNF- α e IL-1 β (IL-15), e expressão de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, e IL-8 (IL-18) (Gosslau et al., 2011).

Para além da via de inflamação dependente do AA, existe ainda uma outra via onde estão incluídas proteínas como NOS, NF- κ B, PPAR e NAG-1. Uma vez que são produzidas e reguladas várias citocinas inflamatórias a nível transcricional, pode ocorrer aumento ou inibição do processo inflamatório. Um dos elos de ligação entre os fatores de transcrição e as citocinas pró-inflamatórias é o recetor ativado pelo proliferador de peroxissomas (PPAR), que consiste num recetor nuclear de hormonas que são ativadas por ligandos específicos endógenos e exógenos. A sua ativação é responsável pelos efeitos pleiotrópicos dos proliferadores de peroxissomas, como a indução enzimática, a proliferação de peroxissomas e o efeito anti-inflamatório. O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso sintetizado bioquimicamente a partir da L-arginina por enzimas NOS (NOS endotelial, NOS neuronal e NOS induzível) constituindo um mediador inflamatório, pelo que a sua inibição tem sido cada vez mais estudada. O NF- κ B é um fator ubiquitário presente no citoplasma

celular, e quando ativado por exemplo por radicais livres, estímulo inflamatório ou endotoxinas, é translocado para o núcleo onde induz a expressão de genes que suprimem a apoptose e induzem a transformação celular, proliferação, invasão, metástase, quimioresistência, radio-resistência e inflamação. A indução do NAG-1 por AINEs constitui um importante mecanismo independente da COX e a diversidade de funções biológicas representadas pela sua nomenclatura sugerem que esta proteína tem uma atividade alargada ao nível da inflamação, cancro e diferenciação (Kim et al., 2004; Yoon e Bark, 2005).

6.3. Ação anti-inflamatória dos compostos fenólicos

No âmbito deste estudo, a ação anti-inflamatória terá especial realce, uma vez que pretendemos avaliar este efeito exercido pelos compostos fenólicos presentes no mirtilo. Estes compostos apresentam propriedades anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*, incluindo processos inflamatórios agudos e crónicos. Testes *in vivo* e *in vitro* demonstram o efeito anti-inflamatório, uma vez que a expressão de genes inflamatórios foi diminuída. Os flavonóides são excelentes inibidores da inflamação porque têm a capacidade de neutralizar radicais livres e por regularem a produção de eicosanóides (Chen et al., 2000; Middleton et al., 2000; Havsteen, 2002; Sanchez de Medina et al., 1996; Raso et al., 2001).

Durante a inflamação, os flavonóides evitam a degradação do tecido conjuntivo devido à sua ação neutralizadora de radicais livres. Além disso, alguns flavonóides exercem ação sobre a hialuronidase, uma enzima que, durante o processo inflamatório hidrolisa agliconas do tecido conjuntivo. Embora a ação desta enzima seja importante para iniciar o processo de reparação do tecido, ela rompe a integridade do mesmo, tornando-o mais suscetível à invasão (Li et al., 1997). A inibição das hialuronidases pelos flavonóides acontece devido à ligação ao local ativo da enzima, competindo com o substrato. Estes compostos também inibem outras metaloproteínases da matriz, como a elastase dos neutrófilos, a qual está intimamente relacionada com o processo inflamatório (Sartor et al., 2002). No caso das collagenases a inibição pode ocorrer devido à complexação com metais no local catalítico da enzima, prevenindo a formação do estado de transição (Fine et al., 1992; Dowd et al., 1995).

Os flavonóides também influenciam a atividade das proteases e fosfolipases (A2). Os produtos da hidrólise destas enzimas são segundos mensageiros envolvidos em muitos processos celulares (Kyo et al., 1998; Mantle et al., 1999). Atuam na inibição de algumas enzimas envolvidas no processo inflamatório, nomeadamente as lipoxigenases (5-LOX) e ciclooxigenases (COX 2) (Gupta et al., 2000; Chen et al., 2000; Raso et al., 2001), diminuem o número de leucócitos imobilizados, inibe a migração destes ao local da inflamação (Riemersma et al., 2001), e podem ainda inibir a desgranulação sem afetar a produção do superóxido (Nijveldt, 2001). Atuam ainda, sobre moléculas reguladoras da expressão génica, inibindo a expressão de COX 2, moléculas de adesão (ICAM-1), citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 α e IL-1 β); e a ativação de NF- κ B, proteína que controla a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Chen et al., 2000; Raso et al., 2001; Lin et al., 2003; Calixto et al., 2003). Os flavonóides também inibem a produção de NO pelos macrófagos, diminuindo a ação vasodilatadora e pró-inflamatória desta molécula (Fushiya et al., 1999; Liang et al., 1999; Chen et al., 2000). Podem ainda inibir oxigenases e peroxidases do processo inflamatório, (COX; xantina oxidase, LOX, MPO), por vários mecanismos: capturando os substratos das enzimas; quelando metais, Fe²⁺ e Cu²⁺ essenciais para a atividade das enzimas; servindo como substrato para a enzima e evitando a oxidação de outras moléculas; ou por formar adutos com a enzima, causando alterações covalentes e inativando-a (Divi e Doerge, 1996; Kostyuk et al., 2003; 2004).

A existência de múltiplos alvos intracelulares para os flavonóides pode ser explicada a partir da competição com o ATP pelo local de ligação nas quinases intracelulares (Middleton et al., 2000). O grupo catecol destes compostos torna-os potentes inibidores da PI-3K e PKC. Inibem a fosforilação de quinases intracelulares e consequentemente, inibem a liberação de TNF- α em macrófagos (Agullo et al., 1997; Gamet-Payraastre et al., 1999). A ação de flavonóides sobre as quimiocinas não se restringe apenas à inibição da síntese destes peptídeos, estes são capazes de se ligarem às

quimiocinas (IL-8 e MIP-1 β) e impedir a ligação destes peptídeos aos seus respectivos recetores (Li et al., 2000).

Uma vez que o mirtilo é rico em compostos fenólicos, e estes, por sua vez, são anti-inflamatórios, considerámos importante estudar o efeito na inflamação, de um extrato de mirtilo, rico nestes compostos.

7. Artrite reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença reumática inflamatória, sistémica e de natureza crónica, caracterizada por sinovite simétrica e erosiva, e pela presença de autoanticorpos (Scott et al., 2010). A presença de autoanticorpos é considerada o fator reumatóide e o anticorpo anti proteína citrulinada (AAPC) pode preceder a manifestação da doença durante muitos anos (Aletaha et al., 2010). Pode ser considerada um síndrome clínico englobando vários acontecimentos patológicos (van der Helm-van Mil e Huizinga, 2008). Estes implicam diversos episódios de inflamação que levam não só a uma situação de inflamação sinovial persistente, mas também aos consequentes danos na cartilagem articular e osso subjacente (van Oosterhout et al., 2008).

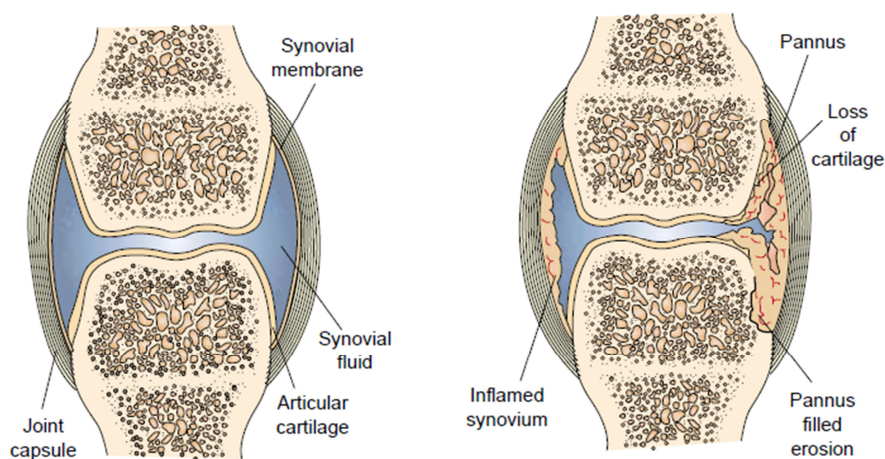


Figura 21 – Patogénese da AR nas articulações (Mattson, 2003)

7.1. Fisiopatologia

As articulações sinoviais, que são normalmente afetadas pela AR, contêm um fluido sinovial que lhes confere uma mobilidade bastante elevada. A maioria das articulações do esqueleto apendicular (membros inferiores e superiores) é deste tipo, refletindo a sua mobilidade superior em relação ao esqueleto axial (crânio, ossículos auditivos, osso hioide, coluna vertebral). A superfície articular óssea está revestida por uma fina camada de cartilagem hialina, no entanto em algumas das articulações sinoviais também podem existir discos articulares, constituídos por fibrocartilagem (temporomandibular, esternoclavicular). A porção dos ossos que se encontra na articulação encontram-se na chamada cavidade articular, que está rodeada por uma cápsula articular. Esta cápsula é constituída por duas camadas: uma fibrosa externa e uma membrana sinovial interna. A cápsula fibrosa é formada por tecido conjuntivo e é contínua com a camada fibrosa do periósteo. A membrana sinovial reveste toda cavidade articular, exceto a cartilagem ou os discos articulares. É uma fina membrana formada por tecido conjuntivo modificado, que pode estar misturada ou separada da cápsula fibrosa. Esta membrana produz fluido sinovial, constituído por filtrado do soro e secreções das células sinoviais. O fluido sinovial forma uma película lubrificante que reveste as superfícies da articulação (Seelly et al., 2008).

O processo inflamatório, normalmente envolve mediadores que iniciam e mantêm a resposta inflamatória, bem como mediadores que terminam o processo. Em estados crónicos de inflamação, o desequilíbrio entre as duas ações dos mediadores culmina com lesão celular (Choy et al., 2001). As células mais afetadas pela artrite reumatóide na articulação são as presentes na cartilagem e na

cápsula sinovial. Os sinoviócitos (células da membrana sinovial) podem ser divididos em fibroblasto-like e macrófago-like; são os macrófago-like que estão na origem da produção excessiva de citocinas inflamatórias (Scott et al, 2010). As células fibroblasto-like com comportamento alterado podem alastrar a outras articulações, induzindo a poliartrite (inflamação de cinco ou mais articulações) e a distribuição sistêmica da artrite reumatóide (Lefèvre et al., 2009).

A membrana sinovial de doentes com AR é caracterizada por hiperplasia, aumento da vascularização e infiltração de células inflamatórias, sobretudo linfócitos T CD4+. Existe uma forte relação entre o sistema major de histocompatibilidade HLA II DR1 e DR4 e o desenvolvimento da doença. A principal função destas moléculas HLA II é a apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4+. Como tal, para o despoletar da doença, será necessário um antígeno artritogénico, que pode ser exógeno, por exemplo, uma proteína viral ou endógeno, tais como a proteína citrulinada, a glicoproteína 39 da cartilagem humana e a proteína ligante das cadeias pesadas. As células apresentadoras de antígenos comunicam com linfócitos T através da ligação TCR-MHC (T cell recetor-major histocompatibility complex); a ativação dos mesmos dá-se pela presença de co estímulos mediados pela família dos recetores CD28-B7. Estes linfócitos estimulam monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais a produzirem citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), e a secretarem metaloproteinases, que aumentam a produção de citocinas e moléculas de adesão celular. Quanto à resposta humoral, os linfócitos T CD4+, por ligação a α 1 β 2 integrinas, CD154 e CD28, ativam os linfócitos B. Estes linfócitos diferenciam-se em plasmócitos produtores de anticorpos, entre os quais se podem destacar os fatores reumatóides (Ig G) e os ACPA. Para além da sua capacidade de produção de anticorpos, os linfócitos B atuam como células apresentadoras de antígenos, e produzem citocinas e quimiocinas (ex.: IL-6, IL-10 e LT β). Outra função importante destas células é o facto de serem essenciais para manter a ativação de células T nos centro germinativos que se formam na articulação e que são encontrados em 20% dos doentes com AR (Takemura et al., 2001). Por fim, e por expressão de ligandos de osteoprotegerina, os CD4+ estimulam a osteoclastogénese, aumentando a degradação óssea (Choy et al., 2001; Feldmann et al., 1996).

Os linfócitos T ativos apresentam diferentes fenótipos consoante as citocinas no meio, podem também diferenciar-se em T helper 1 (TH1) e TH17, estas células têm diversas funções entre as quais se podem destacar: a ativação de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais; ativação de linfócitos B; libertação de diversas citocinas (IL-17, interferão - γ [IFN γ , RANKL]) e enzimas destruidoras da cartilagem e moléculas relacionadas com a destruição do osso (Choy et al., 2001; McInnes e Schett, 2007).

O TNF, IL-1, IL-17 e outras citocinas inflamatórias estimulam a libertação de metaloproteinases (MMP) da matriz a partir de fibroblastos e macrófagos. Das 19 MMPs conhecidas, a MMP1 e MMP3 desempenham um papel importante na artrite reumatóide, degradando as proteínas estruturais da matriz extracelular da cartilagem das articulações (Rengel et al., 2007). As citocinas que estimulam a libertação de MMP também aumentam a expressão e libertação de RANKL a partir dos fibroblastos, macrófagos e linfócitos T, que ativam o RANK à superfície dos precursores dos osteoclastos (Rengel et al., 2007). Este processo é contrariado pela osteoprotegerina, uma proteína solúvel da família dos recetores TNF que funciona como uma “armadilha” para o RANKL, inibindo a produção de osteoclastos. O metabolismo normal do osso depende de um equilíbrio entre a expressão de RANKL e osteoprotegerina (Schett, 2007).

Os sinoviócitos fibroblasto-like também estão ativos na formação do *pannus* - camada anormal de tecido fibrovascular ou granuloso que se forma à superfície da articulação inflamada. A erosão inicial da cartilagem e do osso está associada à presença deste *pannus*, e a interface entre o *pannus* e a cartilagem é ocupada predominantemente por macrófagos ativados e fibroblastos sinoviais que segregam as tais metaloproteinases e catepsinas, levando à erosão da cartilagem e osso (Schett, 2007). A formação de novos vasos sanguíneos – angiogénese - é essencial no processo de proliferação e subsequente formação de *pannus*. Estes novos vasos sanguíneos

acompanham a hipertrofia sinovial e permitem o afluxo de células inflamatórias ao interior da articulação, facilitando a progressão do processo inflamatório (Tracey et al., 2008).

Os macrófagos têm um papel de extrema importância na lesão provocada pela artrite reumatóide, devido à sua abundância na membrana sinovial e na junção da cartilagem. A sobre expressão de MHC classe II, citocinas pró-inflamatórias ou reguladoras e fatores de crescimento (IL-1, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, TNF- α e GM-CSF), indicam-nos que estas células estão claramente ativadas. Embora os macrófagos não sejam a causa da doença, possuem capacidades de remodelação, de destruição e pró-inflamatórias, que contribuem significativamente para a inflamação e destruição da articulação, tanto na fase aguda, como na fase crónica (Kinne et al., 2000).

Na membrana sinovial a camada superficial de macrófagos é seguida de uma camada de fibroblastos. O mero contacto entre estas duas células leva à produção de IL-6, GM-CSF e IL-8, evidenciando o papel dos fibroblastos na reação inflamatória (Kinne et al., 2000).

Por sua vez, o TNF- α e IL-1 induzem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, permitindo o recrutamento de um número reduzido de neutrófilos, mas que ao serem ativados ajudam a criar um meio rico em citocinas pró-inflamatórias que mantêm e amplificam a resposta inflamatória na articulação. Os mecanismos principais pelos quais os neutrófilos contribuem para a resposta inflamatória são: a libertação de grânulos com enzimas de degradação e a produção de citocinas. O conteúdo dos grânulos dos neutrófilos como a mieloperoxidase, elastase, metaloprotease e collagenase provocam dano nos tecidos e amplificam a resposta dos neutrófilos. Por outro lado, os neutrófilos ativados são também capazes de libertarem citocinas como: TNF- α , IL-1, IL-6 e TGF β . Estas citocinas irão afetar os próprios neutrófilos e outras células (Wipke et al., 2001). As elastases e proteases, libertadas por estas células, degradam o proteoglicano existente na camada superficial da cartilagem. A remoção do proteoglicano permite a precipitação de imunocomplexos na camada de colagénio e condrócitos expostos (Choy et al., 2001).

Relativamente aos condrócitos, estes passam de um estado anabólico em que sintetizam matriz, para um estado catabólico com a libertação de metaloproteases e de citocinas, nomeadamente IL-1 β , IL-17, IL-18 e TNF- α , contribuindo desta forma para a degradação da cartilagem (McInnes e Schett, 2007).

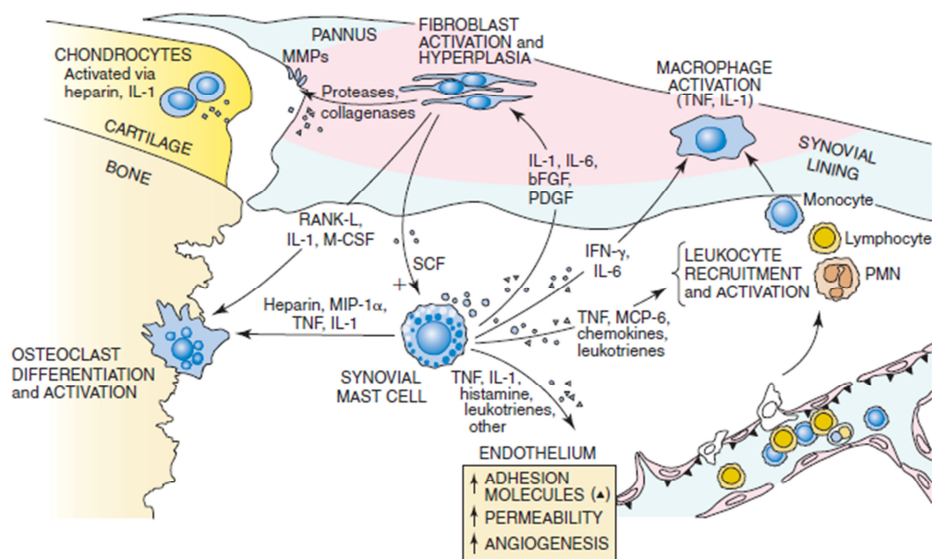


Figura 22 - Vias de inflamação e destruição da articulação na AR (Nigrovic, 2005)

Os linfócitos, macrófagos e fibroblastos promovem a angiogénese, que explica a vascularização aumentada da membrana sinovial de doentes com AR, por libertação de VEGF (fator de

crescimento do endotélio vascular). Na erosão óssea merece lugar de destaque o RANKL, que se liga ao RANK – recetor ativador do fator nuclear Nf-kB. O RANKL regula a reabsorção óssea mediada por osteoclastos e é expresso por uma variedade de células envolvidas na AR, como linfócitos T e sinoviócitos. Estas células, na presença de citocinas, como TNF- α e M-CSF (macrophage colony – stimulation factor; produzido por monócitos, granulócitos, células endoteliais ou fibroblastos), contribuem para a maturação e ativação dos osteoclastos. Para tentar controlar todo este processo, o corpo humano produz osteoprotegerina que funciona como um recetor para a RANKL, impedindo que este ative o Nf-kB e a consequente expressão de genes relacionados com a resposta imunológica (Firestern et al., 2003).

A patogénese da AR não se restringe à ação enzimática, outros mediadores são também responsáveis pela lesão nos tecidos, nomeadamente o peroxinitrito (em menor proporção) e a espécies reativas de oxigénio (ROS), tais como o radical superóxido ou o peróxido de hidrogénio. O stress oxidativo é uma via para indução de danos tecidulares típica de doenças inflamatórias. O desequilíbrio que está na base do aumento da oxidação é gerado, ora por aumento da sua produção, ora por diminuição da ação antioxidante (por exemplo: glutathione peroxidase, vitamina E ou α -tocoferol, superóxido dismutase). Especificamente na AR, o aumento da lesão oxidativa, deve-se sobretudo ao aumento da produção, por parte dos neutrófilos, de TNF- α . O ferro, metal catalisador na produção de radicais através das reações de Haber-Weiss e Fenton, apresenta concentrações elevadas no líquido sinovial de doentes com AR (Altindag et al., 2007; Jaswal et al., 2003; Kannan et al., 2000).

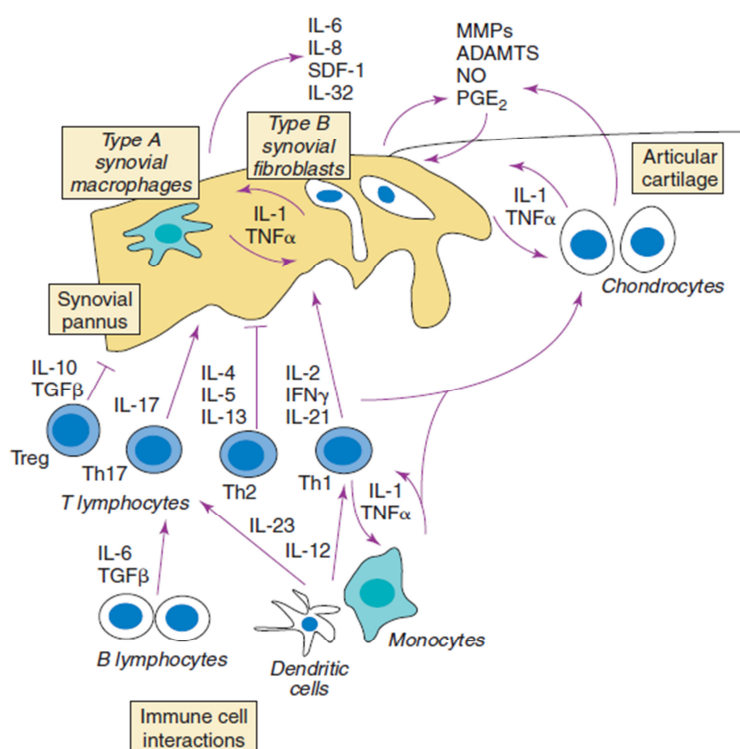


Figura 23 – Mecanismos das células e citocinas envolvidas na destruição da cartilagem na AR (Hochberg et al., 2009)

O fator reumatóide é o autoanticorpo clássico nesta patologia, os marcadores chave na artrite reumatóide são os fatores reumatóides IgM e IgA dirigidos contra a fração Fc das imunoglobulinas IgG. Outro autoanticorpo importante no diagnóstico da patologia é o anticorpo anti péptido citrulinado (ACPA). A grande maioria dos doentes positivos para o fator reumatóide, também o são para o ACPA no entanto, este último é mais específico e sensível e é um indicador de piores prognósticos, tais como a destruição progressiva da articulação (van der Linden et al., 2009). Os doentes positivos para ACPA apresentam mais linfócitos no tecido sinovial, causando danos mais proeminentes nas articulações (van der Helm-van Mil et al., 2005). Já os doentes negativos para

ACPA apresentam mais fibrose e endurecimento da camada do revestimento sinovial, com um prognóstico no entanto mais favorável (van Oosterhout et al., 2008). Independentemente do resultado positivo ou negativo para autoanticorpos, estes atuam em ambos os mecanismos inflamatórios que levam à inflamação da articulação e que acabam por levar à sua destruição, devido à desregulação das citocinas e outros mediadores inflamatórios (McInnes e Schett, 2007; Choy et al., 2001).

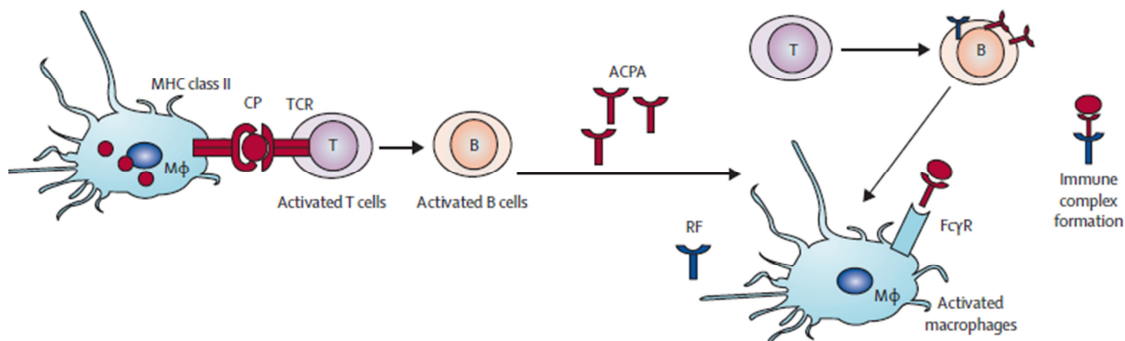


Figura 24 - Patogênese molecular dos doentes com artrite reumatóide ACPA-positiva (Klareskog et al., 2009).

Juntamente com a fadiga (Ek et al., 2001; Moreland et al., 2006), a destruição do osso e cartilagem é um dos grandes efeitos da artrite reumatóide, manifestando-se através de osteopénia, erosão óssea e redução do espaço sinovial observado por radiografia (Plant et al., 1998). Apesar dos mecanismos da destruição do osso e cartilagem serem diferentes, ambos são parcialmente dependentes do processo inflamatório (Pettit et al., 2001; Redlich et al., 2002). A separação dos efeitos, a nível clínico, da destruição de cartilagem e do osso foi demonstrada num ensaio de fase II com um inibidor da RANKL, que preveniu a erosão óssea mas não evitou a inflamação ou a redução do espaço sinovial (Cohen et al., 2008). Importante também referir que os bifosfonatos podem contrariar tanto a osteopénia como as erosões na artrite reumatóide (Jarrett et al., 2006).

7.2. Fatores relacionados com a AR

A AR não é hereditária mas a genética parece influenciar a tendência para sofrer de AR, assim como os fatores ambientais e estocásticos (MacGregor et al., 2000; van der Woude et al., 2009). O tabagismo é o principal fator de risco ambiental para a artrite reumatóide, tornando-a mais agressiva do que em indivíduos não fumadores (Kallberg et al., 2007).

A ANDAR (Associação Portuguesa de Doentes com Artrite Reumatóide) resume a suscetibilidade relativamente à idade e ao sexo: as mulheres são quatro vezes mais afetadas que os homens e trata-se sobretudo de uma doença dos adultos jovens e mulheres pós-menopáusicas, surgindo por volta dos 50 anos de idade (Brennan et al., 1997; Symmons et al., 2002).

A terapia hormonal de substituição já foi descrita como possível fator de proteção na AR (Oliver e Silman, 2006) mas outros autores afirmam não existir evidências sobre os seus efeitos benéficos (Alamanos et al., 2005; Symmons et al., 2002). As transfusões de sangue (Symmons et al., 1997), e as infeções por vírus e bactérias (Jolly et al., 2004; Ramirez et al., 2005) também contribuem para o aumento do risco no desenvolvimento da AR.

O consumo moderado de álcool poderá não só reduzir o risco de desenvolver artrite, mas também diminuir a gravidade da mesma (Aho e Heliovaara, 1993; Jonsson et al., 2007; Kallberg et al., 2008). A dieta alimentar (Pattison et al., 2004; Shapiro et al., 1996) e o consumo de café (Heliovaara et al., 2000) também contribuem para o aumento do risco no desenvolvimento da AR. Sabe-se que a ingestão de refeições muito ricas em açúcares e gorduras podem levar ao aparecimento da obesidade, e induzem a inflamação, uma vez que é o tipo de refeição mais usual nos nossos dias, corre-se o risco de haver permanentemente um estado de inflamação aguda que

facilmente passará a crônica (Stavropoulos-Kalinoglou et al., 2011; Symmons et al., 1997). Daí a importância de incluir na dieta habitual alimentos que contenham compostos antioxidantes e anti-inflamatório.

7.3. Quadro clínico e diagnóstico

A AR é uma doença progressiva, que se não for tratada durante o primeiro ano, a probabilidade de ser controlada diminui bastante, instalando-se o quadro crônico com aumento da destruição e deformação da articulação ao longo do tempo, sendo esta a verdadeira causa da crescente incapacitação. O quadro clínico característico da AR pode ser dividido em três categorias: doença leve, moderada ou grave. A artrite é leve (10% dos doentes), quando se trata de uma doença limitada e que não progride, podendo terminar em remissão espontânea. A maioria dos doentes, cerca de 75%, apresenta artrite moderada com oscilações instáveis entre fases de doença menos ativa e fases mais ativas (flare-up). Os restantes 15% dos doentes dizem respeito às situações de doença grave, ou seja, quando a AR é refratária, progressiva conduzindo a incapacitação e a morte prematura (Marra et al., 2006).

Para o diagnóstico da AR é importante analisar todos os episódios do quadro clínico do doente, dever-se-á ter em consideração várias alterações: na fase inicial a AR é classificada como leve, verifica-se algum edema das articulações (3 ou mais), artralguas, fator reumatóide negativo, e as radiografias não apresentam erosão ou perda de cartilagem; a fase intermédia é classificada como AR moderada, apresenta uma fase de transição caracterizada por maior edema, pelo envolvimento de mais articulações inflamadas (6 a 20), fator reumatóide positivo, elevada VSE ou PCR, e algumas alterações nas radiografias, nomeadamente osteopenia e perda óssea periarticular, apesar de não ser visível a erosão; por fim a fase tardia é classificada como AR grave, é marcada pelo claro edema, pela inflamação e deformação de mais de 20 articulações, sendo visível na avaliação radiográfica, fator reumatóide positivo, elevada VSE ou PCR, anemia de doença crônica, hipoalbuminemia, e declínio acentuado da capacidade motora (Marra et al., 2006).

A AR remete para uma doença localizada, restringindo-se apenas às articulações, contudo poderá apresentar várias manifestações extra-articulares: nódulos reumatóides normalmente nos cotovelos e noutras protuberâncias ósseas; inflamações oculares como episclerite, esclerite, córnea *melt*; doença pulmonar intersticial; olhos e boca seca; vasculites nos pequenos vasos; pleurite; pericardite; e neuropatias como mononeurite e neuropatia periférica simétrica. Poderá também ocorrer perda de peso e osteoporose generalizada, juntamente com a linfadenopatia benigna são visíveis as consequências da inflamação que se estendeu para lá do tecido locomotor. Alguns doentes poderão apresentar sinais e sintomas resultantes da inflamação de outros órgãos: pericardite, pleurite, síndrome de Felty (caracterizado pela tríade AR, esplenomegalia e neutropenia) e várias manifestações de vasculites (Baecklund et al., 2006; Turesson et al., 1999).



Figura 25 – Alterações graves na articulação e osso provocadas pela evolução da AR (Hochberg et al., 2009)

O diagnóstico da AR inicialmente é clínico, e a *guideline* de referência era a publicada pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1987. No entanto, estes critérios revelaram-se

limitados devido à falta de sensibilidade e especificidade na fase inicial da artrite, mas também na distinção da AR de outros diagnósticos reumatológicos. Alguns doentes com artrite num estado inicial foram diagnosticados tendo artrite reumatóide (Banal et al., 2009), mas em outras situações ocorriam falhas na identificação da artrite num estado precoce que mais tarde desenvolveriam a doença (Morvan et al., 2009).

O tratamento eficaz na fase inicial da artrite passou a evitar ou atrasar o aparecimento desta nos doentes que preenchiam os critérios. Dois dos critérios, a erosão da articulação e a doença extra-articular, ocorrem na fase avançada da doença, e podem ser prevenidos pela terapêutica atual (van Dongen et al., 2007).

A apresentação típica engloba poliartrite associada a dor, rigidez e edema nas diversas articulações, de acordo com um padrão simétrico bilateral – só uma minoria apresenta assimetria oligoarticular. O início dos sintomas é insidioso, com os sintomas a emergirem passados semanas ou meses e muitas vezes acompanhados de anorexia, fraqueza ou fadiga. As articulações mais afetadas são as dos punhos, a interfalângica proximal, metacarpofalângica e a metatarsfalângica (Aletaha et al., 2010).

7.4 Interação com outras patologias

A presença de outras doenças juntamente com a AR contribui para o aumento das mortes nos doentes com esta patologia. As doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 40% das mortes em doentes com AR; seguem-se o cancro (17%), infeções (14%), doenças do músculo-esquelético (9%), doenças respiratórias (9%) e doenças renais (9%) (Meune et al., 2010).

A mortalidade associada à artrite reumatóide é maioritariamente atribuída à doença cardiovascular, particularmente à doença isquémica cardíaca. Doentes com artrite reumatóide têm uma maior probabilidade de sofrer enfartes agudos do miocárdio silenciosos e consequente morte súbita (Wallberg-Jonsson et al., 1999; Maradit-Kremers et al., 2005). No entanto, para efeitos de comparação, o risco cardiovascular na artrite reumatóide é três vezes inferior ao existente nos doentes com lúpus eritematoso sistémico (Fischer et al., 2004).

Estudos *coorte* e caso-controlo sugeriram que o risco cardiovascular elevado não se deve tanto aos fatores de risco relacionados com a aterosclerose ou ao tratamento com corticosteroides, mas mais aos próprios processos inflamatórios associados à AR (Del Rincon et al., 2001; Roman et al., 2005). Os sinais da elevada inflamação em doentes positivos para o fator reumatóide ou ACPA e manifestações extra-articulares podem indicar um risco muito elevado de virem a sofrer de doença isquémica cardíaca (Wallberg-Jonsson et al., 1999; Roman et al., 2005; Farragher et al., 2008). O elevado risco de desenvolver linfomas tem sido há muito associado à AR, ainda que não se trate de um efeito comum da doença. Este risco não se relaciona com os tratamentos com imunossuppressores, mas sim com os efeitos a longo prazo da doença (Baecklund et al., 2006).

Foi também descrito um risco mais elevado de desenvolvimento de cancros pulmonares e hematopoiéticos em doentes com AR, ainda que a incidência geral e mortalidade por cancro nestes doentes não seja maior do que a da população em geral (Wolfe et al., 2006). O risco de desenvolvimento de infeções oportunistas como a tuberculose encontra-se mais elevado, cerca de quatro vezes (Carmona et al., 2003).

Muitos estudos demonstraram um aumento de estados depressivos em doentes com AR (Covic et al., 2009), mas pelo contrário, foi demonstrada uma menor ocorrência de esquizofrenia nestes doentes (Eaton et al., 1992). A ANDAR refere que a depressão é o problema psiquiátrico mais frequentemente associado à doença, afetando negativamente o bem-estar psicológico e a qualidade de vida do doente. Tal deve-se à evolução prolongada da artrite, à dor crónica sofrida pelos doentes e à incapacidade progressiva.

7.5 Modelos animais de artrite reumatóide (ensaios *in vivo*)

O evento crucial para o desencadeamento da artrite reumatóide e os fatores que definem a sua cronicidade são ainda desconhecidos e impossíveis, atualmente, de estudar no ser humano. Por este facto torna-se essencial o desenvolvimento de modelos animais que permitam uma caracterização correta da doença, tanto os seus mecanismos moleculares, como a sua utilização para o teste de novos agentes terapêuticos. O recurso a modelos animais para o estudo da AR é uma ferramenta extremamente útil para a caracterização e percepção dos mecanismos imunológicos e inflamatórios subjacentes à doença. Apesar de já se terem usado outras espécies, os modelos com roedores (ratos e murganhos) são mais usados devido ao custo, à homogeneidade genética e à possibilidade de se obterem estirpes geneticamente modificadas no caso dos murganhos. Os roedores têm tendência para apresentarem reabsorção e formação ósseas como resposta a inflamação articular (Kannan et al., 2005; Bendele et al., 2001).

Os modelos de artrite reumatóide podem ser induzidos ou espontâneos em animais geneticamente modificados. Nos modelos de indução de artrite reumatóide existem pelo menos 4 métodos mais utilizados: artrite induzida por colagénio, por anticorpo anti colagénio, por zymosan ou por antigénio. O mais comumente utilizado é o modelo onde a artrite é induzida por colagénio tipo II (AIC). Tendo sido estudado extensivamente ao longo de duas décadas, demonstrou ser bastante útil na avaliação dos efeitos de agentes biológicos, tais como antagonistas do recetor da IL-1 ou recetores solúveis do TNF. Trata-se de um método bastante reprodutível, capaz de gerar anticorpos e terminar com a tolerância do próprio sistema imunitário. AIC é induzida com administração intradérmica de colagénio-tipo II em adjuvante de Freund. O colagénio II heterólogo poderá ser de rato, de origem bovina ou ovina (Bendele et al., 2001).

A metodologia deste modelo de artrite induzida pelo colagénio implica a administração de colagénio do tipo II no 1º e 21º dias, de forma a permitir a imunização. A 1ª administração serve para que o organismo entre em contacto com o antigénio e na 2ª este começa então a produzir anticorpos. De um modo geral, a doença desenvolve-se de forma assimétrica e qualquer articulação poderá ser afetada. O tratamento poderá ser profilático, começando geralmente no dia 21, ou terapêutico, apenas após se observar lesão, estendendo-se de 10 dias a várias semanas (Bendele et al., 2001). Após a primeira injeção surgem sinais de poliartrite com características idênticas à dos humanos, nomeadamente elevada destruição da cartilagem, deposição de imunocomplexos na superfície articular, reabsorção óssea, proliferação periosteal, inflamação periarticular e sinovite. A suscetibilidade varia consoante a estirpe de animal utilizada, devido aos diferentes haplotipos MHC-classe II, em semelhança com os humanos (Asquith et al., 2009).

Objetivos

O objetivo principal do trabalho é a avaliação do efeito de um extrato de mirtilo na resposta anti-inflamatória *in vivo*. Como tal estabeleceram-se objetivos secundários:

1. Preparação de um extrato de mirtilos rico em compostos fenólicos
2. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato
3. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de mirtilo
4. Avaliação *in vivo* da resposta anti-inflamatória de um extrato de mirtilo:

No sentido de atingir estes objetivos procedeu-se da seguinte forma:

Caracterização do extrato de mirtilo

- Técnicas espectrofotométricas (fenóis, antocianinas e flavonóides totais, hidrolisáveis e procianidinas)
- Técnicas cromatográficas (HPLC-DAD-ED e LC-DAD-ESI-MS/MS)

Avaliação da atividade oxidante

- Ensaio ORAC, HORAC e intracelulares (oxidação de neutrófilos)

Avaliação do efeito anti-inflamatório *in vivo*

- Modelo do edema da pata induzido pela carragenina (modelo de inflamação aguda)
- Modelo de artrite reumatóide induzida por colagénio tipo II (CII) (modelo de inflamação crónica)

Materiais e métodos

1. Materiais

1.1. Ensaios de caracterização química

1.1.1. Amostras

Os mirtilos *Vaccinium corymbosum*, da variedade *Southern Highbush*, foram adquiridos durante o mês de Julho de 2012. Os frutos foram conservados inteiros a -18°C até se proceder à sua preparação para as análises a serem desenvolvidas neste estudo.

1.1.2. Reagentes e soluções

Etanol absoluto (Panreac Química Sau); metanol absoluto (Carlo Erba Reagents); acetona 99,9% (Sigma-Aldrich); ácido gálico (Fluka); reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich); carbonato de sódio 99% (Sigma-Aldrich); nitrito de sódio 97% (Sigma-Aldrich); cloreto de alumínio 99,9% (Sigma-Aldrich); hidróxido de sódio 98% (Merck); catequina (Sigma-Aldrich); ácido clorídrico 0,1M (Carlo Erba Reagents); bissulfito de sódio 58,5% SO₂ (Sigma-Aldrich); cianidina-3-glucósido (Extrasynthese); vanilina 99% (Sigma-Aldrich); iodato de potássio 99,5% (Sigma-Aldrich); ácido tânico (BDH-Chemicals); água ultra pura (18.2 MΩ.cm) obtida a partir de um equipamento de Millipore-Direct Q3 UV system (USA); ácido sulfúrico 95–97% (Fluka); ácido fosfórico p.a. 85% (Panreac Química); acetonitrilo *HPLC gradient grade* (VWR); ácido fórmico *HPLC gradient grade* (VWR); ácido clorogénico (Extrasynthese); quercetina-3-O-glucósido (Extrasynthese); quercetina-3-O-ramnósido (Extrasynthese); isoramnetina-3-O-glucósido (Extrasynthese); isoramnetina-3-O-rutinósido (Extrasynthese); canferol-3-O-rutinósido (Extrasynthese); peonidina-3-O-glucósido (Extrasynthese); ácido ferúlico (Fluka); 2',2'-Azobis (2- amidinopropano) dicloridrato (AAPH); 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox); ácido cafeico (Extrasynthese), cobalto tetrahidratado (Sigma-Aldrich); peróxido de hidrogénio (Sigma-Aldrich); dissódico de fluoresceína, FI, (TCL); solução de tampão fosfato (Riedel-de Haën); tetra-floretocobalto, CoF₂, (Sigma-Aldrich); histopaque 1077 e 1119 (Sigma-Aldrich); solução salina de tampão fosfato (Dulbecco), sem cloreto de cálcio e cloreto de magnésio (PBS); solução azul de tripano a 0,4% (Sigma-Aldrich); PMA (Sigma-Aldrich); dimetilsulfóxido, DMSO, (Sigma-Aldrich); trizma (Sigma-Aldrich); D-(+)-glucose (Sigma-Aldrich); luminol (Fluka); cloreto de cálcio di-hidratado, (Merck); sulfato de magnésio (Merck); cloreto de potássio (Pronalab); cloreto de sódio (Honeywell Riedel-de Haën).

1.1.3. Equipamentos e materiais

Espectrofotómetro Beckman DU-70; células de vidro; HPLC da marca Thermo Finnigan (modelo Surveyor) com amostrador automático, bomba, detetor de fotodíodos (DAD) e detetor eletroquímico (DIONEX); LC-MS da Waters® Alliance 2695, equipado com amostrador automático, uma bomba quaternária, acoplado a um detetor de fotodíodos Waters 996 PDA (Waters), e a um espectrómetro de massa Micromass® Quattro micro (Micromass, Waters) equipado com uma fonte de ionização electrospray (ESI) e analisador do tipo triplo quadrupolo. Os *softwares* utilizados para aquisição e processamento de dados dos ensaios no HPLC-DAD foram o ChromQuest e nos ensaios de espectrometria de massa o Masslynx versão 4.1.

1.2. Ensaios *in vivo*

1.2.1. Animais

Para o ensaio da artrite reumatóide (inflamação crónica) utilizaram-se 11 ratos Wistar Kyoto machos, e no ensaio de inflamação aguda induzida por carragenina utilizaram-se 14 ratos Wistar Kyoto também machos. Todos os animais foram sujeitos a um período de aclimação no biotério de Manutenção da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, à temperatura de 25°C e com ciclos de luz diários de 14 horas, com uma dieta de manutenção IPM-R20 (Letica) e água *ad libitum*. Todos os animais foram manuseados de acordo com o *Guidance in the Operation of*

Animals (Scientific Procedures) Act 1986, Reino Unido e com as regulamentações da União Europeia (Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 358/1 de 18/12/1986).

1.2.2. Reagentes e Soluções

Solução fisiológica estéril (B.Braun); solução Triton X-100 (BDH-Chemicals); ácido acético glacial (Carlo Erba Reagents); colagénio (Sigma-Aldrich); adjuvante de Freund (Sigma-Aldrich); carragenina (Sigma-Aldrich); e água desionizada (Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa).

1.2.3. Equipamentos

Pletismómetro (Digital Plethysmometer LE7500 – Letica Scientific Instruments); Raio-X: Philips Optimus ZBC6 (consola) inclui: Philips Bucky Diagnostic Philips Device LeftOrtopantomógrafo OP100Ortoceph OC100Kodak Direct View CR Long – Length VerticalApelem Baccara (consola e equipamento) e processador de imagem.

2. Métodos

2.1. Preparação dos extratos

2.1.1. Preparação das soluções extratantes

A preparação das soluções extratantes, bem como o tipo de tratamento dado à amostra, para a extração de compostos fenólicos encontram-se descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Solventes extratantes e tipo de tratamento utilizado nas amostras de mirtilo

	Soluções extratantes	Tratamento da amostra
Extrato 1	Solução Metanol 80% (80 mL metanol + 20 mL água)	Trituração com ultraturrax
Extrato 2	Solução Acetona 70% (70 mL acetona + 30 mL água)	
Extrato 3	Solução Etanol 60% (60 mL etanol + 40 mL água)	
Extrato 4	Solução Metanol 80% (80 mL metanol + 20 mL água)	Azoto líquido e posterior trituração em almofariz
Extrato 5	Solução Acetona 70% (70 mL acetona + 30 mL água)	
Extrato 6	Solução Etanol 60% (60 mL etanol + 40 mL água)	

2.1.2. Preparação do extrato de mirtilo rico em compostos fenólicos

Para a preparação dos extratos utilizou-se a metodologia descrita por [You et al. \(2011\)](#) com algumas modificações. Prepararam-se 6 extratos, e para cada um deles pesaram-se 10 gramas de amostra. Nos extratos 1, 2 e 3 adicionaram-se 25mL da solução extratante aos frutos inteiros e triturou-se com o ULTRATURRAX a 8000 rpm, durante 8 minutos, enquanto que nos extratos 4, 5 e 6 adicionou-se azoto líquido aos frutos inteiros e triturou-se num almofariz até à obtenção de um pó, de seguida adicionaram-se os 25mL de solução extratante. Todos os extratos foram agitados durante 1 minuto no vórtex, e foram submetidos a um banho de ultrassons, durante 30 minutos a 30°C. Centrifugou-se a 6000 rpm, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionaram-se mais 25mL de solução extratante ao sedimento. Repetiu-se o processo a partir da adição do solvente até à recolha do segundo sobrenadante, que se adicionou ao primeiro. Concentraram-se os extratos no evaporador rotativo, até um volume de 10mL. Por fim, todos os extratos foram filtrados, com filtros de 0,45 µm, e congelados a -18°C até às análises seguintes.

Para a preparação do extrato que foi administrado aos animais utilizou-se o mesmo procedimento do extrato 6 que apresentou os melhores resultados, com as seguintes modificações: foram usadas 100 gramas de amostra e 500 mL de solvente extratante. O extrato concentrado foi diluído (1:2) antes da administração aos animais para respeitar a dose máxima diária que se queria estudar.

2.2. Determinação do teor de fenóis totais pelo Método de *Folin-Ciocalteu*

Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método descrito por Stamatakis et al. (2009), com algumas modificações.

2.2.1. Preparação de soluções padrão de ácido gálico

Pesou-se 10 mg de ácido gálico e dissolveu-se numa solução de metanol:água (80:20 v/v), perfazendo o volume para um balão volumétrico de 10 mL (solução mãe com concentração de 1000 ppm). A partir desta solução preparou-se uma outra de 100 ppm com a solução de MeOH:água (80:20 v/v). A partir desta segunda solução prepararam-se as soluções padrão na gama de concentrações entre 1-6 ppm em água desionizada que foram utilizadas na construção da reta de calibração (anexo 1).

2.2.2. Análise do teor de compostos fenólicos totais

Procedeu-se à diluição dos extratos (1:1000) com água desionizada. Assim, em tubos de ensaio, adicionaram-se 3500 µL de cada extrato diluído, 100 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* e homogeneizou-se no vórtex. Deixou-se três minutos à temperatura ambiente a repousar, adicionou-se 400 µL de uma solução de carbonato de sódio a 35% (peso/volume). Deixou-se repousar durante 1 hora, à temperatura ambiente. Findo este tempo, procedeu-se à medição da absorvância dos extratos num espectrofotómetro a 725 nm, numa célula de vidro com 1 cm de espessura, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo o extratos por água ultrapura. Todos os extratos foram analisados em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada com soluções padrão de ácido gálico.

O procedimento utilizado na análise das soluções padrão foi igual ao utilizado para os extratos. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de fruto.

2.3. Determinação do teor de antocianinas totais

O doseamento das antocianinas totais foi efetuado de acordo com o procedimento descrito na literatura com algumas modificações (Sommers e Evans, 1976).

2.3.1. Preparação de soluções

Solução de HCl (2%)

Pesou-se 5,4 mL de HCl, transferiu-se para um balão de 100 mL e completou-se o volume do balão com água desionizada.

Solução de bissulfito de sódio (20%)

Pesou-se 20 g de bissulfito de sódio, transferiu-se para um balão de 100 mL e completou-se o volume do balão com água desionizada.

Solução padrão de cianidina-3-O-glucósido

Pesou-se 5 mg de cianidina-3-O-glucósido e dissolveu-se em água destilada, perfazendo o volume para um balão volumétrico de 5 mL (solução mãe com concentração de 1000 ppm). A partir da solução anterior prepararam-se soluções padrão na gama de concentrações entre 10-150 ppm, que foram utilizadas na construção da reta de calibração (anexo 2).

2.3.2. Análise do teor de antocianinas totais

Procedeu-se à diluição dos extratos com água desionizada, 1:10 (extratos 1, 2, 3, 5) e 1:100 (extratos 4 e 6). Num tudo de ensaio adicionou-se 5 mL de solução de HCl (2%), 250 µL de etanol e 250 µL de cada amostra diluída. De seguida, pipetou-se 1,25 mL da solução anterior para dois tubos de ensaio por cada amostra. Num dos tubos de ensaio adicionou-se 500 µL de solução de

bissulfito de sódio (20 %). No outro tubo de ensaio, que funcionou como referência, adicionou-se 500 µL de água destilada. Agitou-se no vórtex e colocaram-se todos os tubos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente durante 20 minutos. Findo este tempo, procedeu-se à medição da absorvância dos extratos num espectrofotómetro a 520 nm, numa célula de vidro com 1 cm de espessura, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo o extratos por água desionizada. Todos os extratos foram analisados em triplicado, tendo a concentração em antocianinas sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada com soluções de cianidina-3-O-glucósido.

O procedimento utilizado na análise das soluções padrão foi igual ao utilizado para os extratos. O valor final corresponde à diferença entre o valor da absorvância a 520 nm da cianidina-3-glucósido em bissulfito de sódio (solução referência) e o valor da absorvância a 520 nm da cianidina-3-glucósido em água desionizada (por solução padrão). Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de cianidina-3-O-glucósido por 100 gramas de fruto.

2.4. Determinação do teor de flavonóides totais

O procedimento utilizado foi o descrito por Çam et al., 2010 com algumas modificações.

2.4.1. Preparação de soluções

Solução de NaNO₂ (5%)

Pesou-se 5 gramas de NaNO₂ para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água desionizada.

Solução de AlCl₃ (10%)

Pesou-se 10 gramas de AlCl₃ para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água desionizada.

Solução de NaOH (1M)

Pesou-se 3,9 gramas de NaOH para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água desionizada.

Solução padrão de catequina

Pesou-se 5 mg de catequina e dissolveu-se com metanol, utilizando um balão volumétrico de 5 mL (solução mãe com concentração de 1000 ppm). A partir da solução anterior prepararam-se as soluções padrão na gama de concentrações entre 20-100 ppm, que foram utilizadas na construção da reta de calibração (anexo 3).

2.4.2. Análise dos teores totais de flavonóides totais

Procedeu-se à diluição (1:20) dos extratos com água desionizada. Pipetou-se 0,5 mL do extrato diluído para um balão volumétrico de 5 mL, adicionou-se 2 mL de água e 150 µL da solução de NaNO₂ (5%) e aguardou-se 5 minutos. Adicionaram-se 150 µL da solução de AlCl₃ (10%) e aguardou-se mais 6 minutos. Por fim, adicionou-se 1 mL da solução NaOH (1M) e completou-se o volume do balão com água, a solução adquiriu uma coloração rosa. Procedeu-se à medição da absorvância dos extratos num espectrofotómetro a 510 nm, numa célula de vidro com 1 cm de espessura, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo o extratos por água desionizada. Todos os extratos foram analisados em triplicado, tendo a concentração em flavonóides sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada com soluções de catequina.

O procedimento utilizado na análise das soluções padrão foi igual ao utilizado para os extratos. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de catequina por 100 gramas de fruto.

2.5. Determinação do teor de taninos hidrolisáveis

O método utilizado foi o descrito por Çam e colaboradores em 2010 com algumas alterações.

2.5.1. Preparação de soluções

Solução de KIO_3 (2.5%)

Pesou-se 2,5 gramas de KIO_3 , transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada.

Solução padrão de ácido tânico

Pesou-se 50 mg de ácido tânico, dissolveu-se em água, utilizando um balão volumétrico de 10 mL (solução mãe com concentração de 5000 ppm). A partir da solução anterior prepararam-se soluções padrão na gama de concentração entre 300-1700 ppm, que foram utilizadas na construção da reta de calibração (anexo 4).

2.5.2. Análise do teor de taninos hidrolisáveis

Procedeu-se à diluição dos extratos com água desionizada, 1:5 (extratos 1, 2, 3, 4 e 5) e 1:10 (extrato 6). Pipetou-se 0,4 mL do extrato diluído e adicionou-se 2 mL da solução de KIO_3 (2.5%). Aguardou-se 2 minutos verificando-se a alteração da cor da amostra para vermelho. Procedeu-se à medição da absorvância dos extratos num espectrofotómetro a 550 nm, numa célula de vidro com 1 cm de espessura, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo o extratos por água desionizada. Todos os extratos foram analisados em triplicado, tendo a concentração em taninos hidrolisáveis sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada com soluções de ácido tânico.

O procedimento utilizado na análise das soluções padrão foi igual ao utilizado para os extratos. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido tânico por 100 gramas de fruto.

2.6. Determinação do teor de procianidinas totais

O método utilizado para a determinação do teor de procianidinas nas amostras foi o descrito por Sun et al. (1998), com algumas modificações.

2.6.1. Preparação de soluções

Solução de vanilina (1%)

Pesou-se 1 g de vanilina, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol.

Solução de ácido clorídrico (8M)

Mediu-se 64,9 mL de ácido clorídrico, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com etanol.

Solução padrão de catequina

Pesou-se 5 mg de catequina e dissolveu-se em etanol para um balão volumétrico de 5 mL (solução mãe com concentração de 1000 ppm). A partir da solução anterior prepararam-se soluções padrão na gama de concentração entre 20-120 ppm, que foram utilizadas na construção da reta de calibração (anexo 5).

2.6.2. Análise do teor de procianidinas

Procedeu-se à diluição (1:100) dos extratos com água desionizada. Pipetou-se 250 μ L de cada um dos extratos para tubos de ensaio separadamente, adicionou-se 750 μ L de solução vanilina (1%) e 1,5 mL da solução de HCl (8M) em cada tubo. De seguida agitou-se no vórtex e colocaram-

se os extratos no escuro e aguardou-se 25 minutos. Findo este tempo, procedeu-se à medição da absorvância dos extratos num espectrofotómetro a 500 nm, numa célula de vidro com 1 cm de espessura, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo o extratos por etanol. Todos os extratos foram analisados em triplicado, tendo a concentração em procianidinas sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada com soluções de catequina.

O procedimento utilizado na análise das soluções padrão foi igual ao utilizado para os extratos. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de catequina por 100 gramas de fruto.

2.7. Caracterização da composição fenólica por cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detetor de díodos e eletroquímico (HPLC-DAD-ED)

2.7.1. Preparação de soluções

Soluções das misturas padrão

Todos os padrões presentes nas misturas têm uma concentração de 20 ppm e foram diluídos em água, a partir de uma solução mãe preparada em metanol.

2.7.2. Análise cromatográfica

Filtrou-se o extrato preparado inicialmente, com um filtro 0,45 µm, e injetou-se 20 µL do extrato diluído 1:10. O sistema HPLC-DAD-ED estava equipado com uma coluna de fase reversa RP-18 (5µm) 250×4 Lichrocart, com temperatura fixa a 35°C, e pré-coluna RP- 18 (5µm) da Merck. O gradiente de eluição está descrito na tabela 8 e é constituído por dois eluentes, o eluente A: 0,1% de ácido fosfórico *p.a.* e o eluente B: 0,1% de ácido fosfórico *p.a.* + 400 mL de acetonitrilo Gradient Grade + 599 mL de água milli-Q. O fluxo da fase móvel foi de 0,700 mL/min com um tempo total de análise de 120 minutos, incluindo o tempo de estabilização da coluna.

Tabela 8 - Gradiente de eluição dos solventes para separação de compostos fenólicos

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0,10	100,00	0,00
15,00	80,00	20,00
25,00	80,00	20,00
70,00	30,00	70,00
75,00	30,00	70,00
85,00	0,00	100,00
110,00	0,00	100,00
111,00	100,00	0,00
120,00	100,00	0,00

O detetor de díodos efetuou um varrimento de 192 aos 798 nm, a uma velocidade de 1 Hz e uma largura de banda de 5 nm para 3 canais individuais (254 nm, 280 nm e 360 nm) e uma velocidade de 10 Hz com uma largura de banda de 11 nm. Para a aquisição de dados foi utilizado o *software* Chromquest. O detetor eletroquímico tinha na sua constituição um elétrodo de carbono vítreo e efetuava medições de sinal em gamas de potenciais entre – 1,0 V e 1,0 V com um varrimento no tempo de 1,00 segundo (deteção por voltametria integrada usando uma variação cíclica do potencial). As medições foram feitas com uma frequência de 50Hz com um conversor analógico/digital, utilizando o *software* 4880 da Unicam para aquisição de dados.

A identificação dos compostos foi feita, sempre que possível, por comparação com os tempos de retenção e os espectros dos respetivos padrões, preparados e injetados nas mesmas condições, seguindo-se as sobrecargas para a confirmação. Relativamente à quantificação, esta seguiu o método do padrão externo, onde foram feitas retas de calibração que relacionam as áreas dos picos com a concentração do composto.

2.8. Caraterização de compostos fenólicos por cromatografia líquida associada a um detetor de espectroscopia de Massa (LC-ESI-MS/MS)

2.8.1. Análise cromatográfica

O método utilizado tem a duração de 130 minutos que inclui o período de estabilização da coluna, e a deteção foi feita para comprimentos de onda entre 210-600 nm. Nas análises foi utilizada uma coluna RP-18, Synergy, 2.5 μm (100 \times 2.00 mm) Max-RP (Phenomenex, USA), a uma temperatura de 35°C. O volume de injeção utilizado foi de 20 μL e os eluentes utilizados foram A: solução de ácido fórmico *p.a* (0,5%) em água ultra pura e B: acetonitrilo grau para LC-MS. O fluxo da fase móvel era de 0,3 mL/min e o gradiente de eluentes utilizado foi o descrito na tabela 9.

Tabela 9- Programa de eluentes ao longo da análise no LC-ESI-MS/MS

Time	A%	B%
0,0	99,0	1,0
15,0	90,0	10,0
20,0	89,0	11,0
30,0	89,0	11,0
45,0	85,0	15,0
55,0	85,0	15,0
95,0	70,0	30,0
100,0	70,0	30,0
105,0	10,0	90,0
110,0	10,0	90,0

Quanto às condições do espectrómetro de massa na fonte de ionização foi utilizado o modo positivo para a análise das antocianinas e modo negativo para análise dos compostos fenólicos e alguns ácidos orgânicos com o capilar a 3,00 kV e o cone a 20 V. A temperatura da fonte era de 120°C e aplicou-se a energia de colisão de 20 e 25 eV nas experiências de fragmentação. O azoto de elevada pureza (N₂) foi utilizado como gás de secagem e como gás de nebulização, para a colisão foi utilizado o árgon (Ar). O detetor de díodos fez um varrimento dos 210 aos 600 nm. Os dados obtidos foram analisados e tratados com o *software* Masslynx, versão 4.1.

2.9. Avaliação da atividade antioxidante

2.9.1. Determinação do resgate do radical peroxilo pelo ensaio ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”)

O procedimento ORAC utilizado foi o descrito por Ou et al. (2001) com algumas modificações segundo Serra et al. (2010). A composição da mistura para a reação foi de $6,3 \times 10^{-8}\text{M}$ FL, $1,28 \times 10^{-2}\text{M}$ AAPH, preparada em 75 mM de tampão fosfato com um pH de 7,4, e a amostra diluída para um volume final de 1,8 mL. A reação foi iniciada com a adição de AAPH à mistura colocada numa cuvete de 10 mm, a 37°C. A fluorescência emitida pela forma reduzida de FL foi medida e registada a cada 1 minuto a um comprimento de onda de emissão de 515 nm e de excitação de 493 nm (espectrofotómetro de fluorescência com banho termostático, Eclipse modelo Cary, Varian Ltd., Surrey, Reino Unido) durante um período de 30 min. O tampão fosfato (75 mM, pH=7,4) foi também utilizado como branco, e foram utilizadas soluções de 1, 5, 12,5, 25 e 50 μmol de Trolox como padrões de controlo. Todas as amostras, incluindo o ensaio em branco e os controlos, foram analisadas em triplicado. Os valores finais de ORAC foram calculados utilizando uma equação de regressão entre a concentração de Trolox e a área abaixo da curva de decaimento de FL. Os dados foram expressos em μmol de equivalentes de Trolox (TEAC) por litro de extrato de mirtilo (valor médio \pm erro padrão).

2.9.2. Determinação do resgate do radical hidroxilo pelo ensaio HORAC ("Hydroxyl Radical Averting Capacity")

O ensaio HORAC foi baseado num método já relatado anteriormente por Ou *et al.* (2002) modificado para um leitor de microplacas FL800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) descrito por Serra *et al.* (2010). Adicionou-se 10 µL de cada amostra a uma mistura de 180 µL de FL (4×10^{-3} µM) e 10 µL de CoF_2 (0,79 mg/mL). A reação foi iniciada com a adição de 5 µL de H_2O_2 (1,1 M) numa microplaca, a 37°C. A fluorescência emitida pela forma reduzida de FI foi medida e registada a cada 1 minuto durante aproximadamente 35 minutos. A microplaca foi lida utilizando filtros de fluorescência para comprimentos de onda de excitação de 485 ± 20 nm e de emissão de 530 ± 25 nm, este leitor de placas foi controlado pelo *software* Gen5. O ácido cafeico foi usado como padrão, pois proporciona uma gama mais linear em relação ao ácido gálico (Dubost *et al.*, 2007). As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados finais de são calculados através da regressão linear entre os valores da concentração de ácido cafeico e a área abaixo da curva de decaimento da fluoresceína, sendo expressos em µmoles de equivalentes de CAE/L de extrato de mirtilo (valor médio \pm erro padrão).

2.9.3. Atividade antioxidante intracelular

Este ensaio foi realizado no laboratório de Toxicologia, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

2.9.3.1. Isolamento de neutrófilos humanos

Coletou-se sangue venoso de voluntários saudáveis por punção venosa antecubital, em tubos de vácuo K3EDTA, com o consentimento de todos os indivíduos. Os neutrófilos humanos foram isolados por gradiente de densidade, tal como previamente relatado por Freitas *et al.* (2008). Sucintamente, 3 mL de histopaque 1077 foram cuidadosamente colocados em camadas por cima de 3 mL de histopaque 1119 num tubo de plástico de 15 mL. De seguida, 4,5 mL do sangue recolhido foi decantado na zona superior do gradiente de densidade descontínuo. O tubo foi centrifugado a 890 g durante 30 minutos a 20°C. Após a centrifugação, o sedimento foi removido com uma pipeta de Pasteur e dobrou-se o volume com PBS, que reduz a viscosidade da suspensão neutrófilos-histopaque, de modo a que as células possam ser centrifugadas com forças (g) menores. Os neutrófilos foram, então, centrifugados a 870 g por 5 minutos a 4°C. De seguida decantou-se o sobrenadante e adicionou-se uma mistura de 1,25 mL de PBS + 5,25 mL de água destilada estéril ao sedimento composto pelos neutrófilos, com o intuito de lisar os restantes glóbulos vermelhos. O tubo foi invertido suavemente durante 2 minutos, a isotonicidade foi restabelecida adicionando 2,2 mL de NaCl a 3%. Esta suspensão foi então submetida a uma nova centrifugação a 870 g durante 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi decantado e o sedimento foi novamente suspenso em PBS.

As suspensões obtidas continham mais de 99% de neutrófilos, mais de 95% destas células mostraram-se viáveis à exceção da solução de azul de tripano a 0,4%. Os neutrófilos isolados foram mantidos em gelo até à sua utilização. O meio de incubação utilizado foi o *Tris Glucose* (25 mM Tris, 1,26 mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5,37 mM KCl, 0,81 mM de $MgSO_4$, 140 mM de NaCl, e 5,55 mM de D-glucose), tal como foi previamente recomendado por Freitas *et al.* (2009).

2.9.3.2. Avaliação do *burst* oxidativo dos neutrófilos

A quimioluminescência do luminol tem sido muito utilizada para monitorizar a produção de espécies reativas pelos neutrófilos, nomeadamente o radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^{\bullet}), ácido hipocloroso ($HOCl$), óxido nítrico ($\bullet NO$) e o anião peroxinitrito ($ONOO^-$) (Freitas *et al.*, 2009). A medição do *burst* oxidativo dos neutrófilos foi realizada por quimioluminescência, isto é, monitorização da oxidação do luminol pelas ROS, de acordo com o procedimento descrito por Fernandes *et al.* (2006). As misturas utilizadas nesta reação continham neutrófilos (1×10^6 cells/mL) e os seguintes reagentes (volume final de 250 mL):

luminol (500 μ M) e PMA (160 nM). As células foram pré-incubadas com o luminol e com o extrato de mirtilo, nas diferentes concentrações, durante 5 minutos, antes da adição do PMA. As medições foram realizadas a 37°C com agitação suave e contínua. As leituras cinéticas foram iniciadas imediatamente após a estimulação das células, as medições foram realizadas no pico da curva durante cerca de 10 minutos. Os resultados são expressos na percentagem de inibição da oxidação do luminol. Foram testadas 6 concentrações diferentes para o extrato de mirtilo, e todas estas foram realizadas em triplicado.

Os resultados dos ensaios feitos em neutrófilos foram tratados estatisticamente no *software GraphPad Prism™* (versão 5.0), e expressos em média \pm erro padrão. A comparação estatística entre os 6 grupos foi estimada usando a análise da variância (ANOVA), seguida do teste de *Bonferroni*. Os resultados são considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

2.10. Ensaios *in vivo*

2.10.1. Ensaio edema da pata induzido por carragenina (inflamação aguda)

A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas marinhas vermelhas (Hui et al., 2006) e sua administração desencadeia um estímulo quimiotático que culmina na infiltração de neutrófilos e macrófagos no local da inflamação consequentemente desencadeia um processo inflamatório local. Os neutrófilos e macrófagos ativados produzem o anião superóxido através da reação catalisada pela NADPH oxidase. A produção deste radical livre aumenta a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD), que desta forma é ativada e catalisa a dismutação em peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular. Através da reação de Fenton, o peróxido de hidrogénio formado pode originar o radical hidroxilo. Segue-se então uma amplificação desta resposta, com libertação de outras moléculas como IL-6, o TNF- α , IL-1 β , o NO, peroxinitrito e várias prostaglandinas (Di Rosa et al., 1971; Loram et al., 2007).

Este modelo permite testar o efeito dos compostos tanto na fase aguda como na subaguda do processo inflamatório pelo facto do edema ser precisamente um dos sinais cardinais da inflamação.

2.10.1.1. Procedimento experimental

Os animais (n=14) foram identificados, pesados e aleatoriamente divididos em três grupos descritos na tabela 10.

Tabela 10 – Grupos do ensaio *in vivo* e a sua caracterização

Grupos n	Controlo negativo 4	Controlo positivo 4	Mirtilo 6
Peso	\pm 200 gramas	\pm 200 gramas	\pm 200 gramas
Administração subcutânea na base da cauda	Soro fisiológico	Carragenina	Carragenina
Tratamento oral	água desionizada	água desionizada	1,4 mL extrato (12,5mg/Kg de rato de compostos fenólicos)
Representação	Sem edema	Edema	Edema <C+

A indução do edema na pata nos grupos C+ e Mirtilo foi conseguida após uma injeção subplantar de 100 μ l de uma solução de 1% de carragenina- λ em soro fisiológico. Inicialmente administrou-se com sonda intra-gástrica 1,4 mL do extrato de mirtilo (12,5mg/Kg) ao grupo Mirtilo e água aos restantes controlos. Marcaram-se as patas e após 30 minutos injetou-se na planta da pata a solução de carragenina- λ . Cada animal foi marcado com tinta (resistente à água) na articulação da pata esquerda ou de ambas, no caso do tamanho das patas ser diferente, ao nível do maléolo, eminência óssea do tornozelo, procedendo-se em seguida à medição do seu volume. Ao momento da administração da carragenina atribuiu-se o tempo zero (t=0h), procedendo-se imediatamente à medição do volume da pata esquerda, repetindo-se esta medição 3 e 6 horas depois, dando por terminado o ensaio (t=6h).

Todas as medições do volume da pata foram feitas no pletismómetro, obtendo-se depois uma média. A pata é imersa numa solução de tensioativo [Triton X-100 0,15% (v/v) e cloreto de sódio 0,1%] contida num vaso pertencente a um sistema de dois vasos comunicantes, sendo registada a variação de volume.

2.10.2. Ensaio artrite reumatóide induzida pelo colagénio-tipo II (inflamação crónica)

Neste modelo experimental a artrite é induzida pela injeção de colagénio tipo II (CII), um componente da matriz extracelular das cartilagens localizadas em articulações diartroses, responsáveis pelos movimentos. A indução de artrite crónica em ratos imunizados com CII mostrou que alguns animais, não todos tal como os pacientes doentes com AR, apresentam elevadas taxas de anticorpos dirigidos ao CII (Cuzzocrea et al., 2000).

A utilização deste modelo é bastante fiável uma vez que existem muitas similaridades entre a patologia articular na artrite induzida por colagénio-II (AIC) e a AR nos humanos, nomeadamente padrões similares de sinovite, formação de *pannus*, erosão da cartilagem e osso, fibrose, e perda funcional da articulação. A suscetibilidade, tanto dos humanos com AR como nos animais com AIC, está associada aos genes que codificam a classe II das principais moléculas do complexo de histocompatibilidade. Em ambos os casos, há um aumento nos níveis de monóxido de azoto (NO) gerados pela sua síntese e pela ativação de múltiplas cascatas de sinalização inflamatória, como a libertação de citocinas (TNF- α e IL-1 β) (Yamada et al., 2009).

2.10.2.1. Preparação da emulsão de colagénio-tipo II em adjuvante de Freund

Preparação da solução de ácido acético 0,01M

Pipetou-se 0,6 mL de ácido acético para um balão de 100 mL, completou-se o volume com água, obtendo-se uma solução de ácido acético a 0,1 M, pipetou-se 10 mL da solução 0,1 M para um balão de 100 mL e completou-se com água, obtendo-se a solução de ácido acético 0,01 M.

Preparação da emulsão de Colagénio II

Pesou-se 4,2 mg de colagénio, acrescentou-se 2,1 mL da solução de ácido acético 0,01 M, deixou-se uma noite em agitação a 4°C, com recurso a agitador magnético. Aquando da administração nos animais, adicionou-se 2,1 mL do adjuvante de Freund.

2.10.2.2. Procedimento experimental

Neste ensaio o modelo de artrite reumatóide utilizado foi o de indução por colagénio-tipo II. Os animais (n=11) foram identificados, pesados e aleatoriamente divididos em três grupos descritos na tabela 11.

Tabela 11 – Grupos do ensaio *in vivo* e a sua caracterização

Grupos	Controlo negativo (C-)	Controlo positivo (C+)	Mirtilo
n	3	3	5
Peso	± 250 gramas	± 250 gramas	± 250 gramas
Administração subcutânea na base da cauda	Soro fisiológico	Colagénio tipo II	Colagénio tipo II
Tratamento diário oral	2 mL água desionizada	2 mL água desionizada	2,1 mL extrato (12,5mg/Kg de rato de compostos fenólicos)
Representação	Ausência de doença	Doença sem tratamento	Doença com tratamento

A indução da doença nos grupos C+ e Mirtilo foi conseguida com duas administrações subcutâneas na base da cauda de 100 µl de uma emulsão de colagénio-tipo II em ácido acético 0,01 M e adjuvante de Freund, cuja preparação se encontra descrita no ponto anterior, para sensibilizar os animais e induzir a produção de anticorpos. A primeira administração foi realizada no 1º dia do protocolo, permitindo o organismo entrar em contato com o antigénio, e a segunda administração ao 21º dia, induzindo a produção de anticorpos. Do 23º ao 35º dia foi administrado o extrato de mirtilo (na concentração de 12,5 mg fenóis totais/kg) diariamente e sempre de forma intra-gástrica com o auxílio de uma sonda, ao grupo Mirtilo e água aos outros 2 grupos (C- e C+). Ao 35º dia foi feita a medição do volume da pata esquerda ou de ambas (no caso do tamanho das patas ser diferente) no pletismómetro, obtendo-se depois uma média. A pata é imersa numa solução de tensioativo [Triton X-100 0,15% (v/v) e cloreto de sódio 0,1%] contida num vaso pertencente a um sistema de dois vasos comunicantes, sendo registada a variação do volume.



Figura 26 - Avaliação do volume da pata no pletismómetro

Os animais foram anestesiados e de seguida sacrificados, radiografou-se a mesma pata de cada rato. Os resultados das radiografias às patas foram comparados com os resultados dos animais do grupo de controlo -.

2.10.3. Cálculo do volume de extrato de mirtilos a administrar por animal

A concentração de fenóis totais definida para o presente estudo foi de 12,5 mg/kg de rato e o teor determinado experimental para o extrato de mirtilo foi de 3,54 mg/mL de extrato. No ensaio da artrite reumatóide o peso médio dos ratos era de 250 gramas, a dose a ser administrada teria de ter 3,12 mg de fenóis por rato. O extrato foi diluído (1:2) com água, uma vez que não é aconselhável administrar menos de 1 mL de extrato aos animais. Portanto, 1mL de extrato passou a ter 1,77 mg de fenóis totais em vez de 3,54 mg, logo foi administrado 2,1 mL de extrato por dia aos animais. No ensaio do edema da pata os cálculos são iguais, o peso é o único fator que se altera, sendo de 200 gramas, logo, a dose a ser administrada foi de 2,5 mg de fenóis por rato, o que equivale a 1,4 mL de extrato numa única dose.

2.10.4. Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados de edema da pata obtidos foram expressos em percentagem do aumento do volume da pata relativamente ao volume inicial da mesma. A fórmula utilizada para calcular essa percentagem foi $\% = [(V-V_0)/V_0] * 100$, onde V corresponde ao volume da pata no final dos ensaios e V0 o volume da pata inicialmente sem a doença.

Para efeito de tratamento estatístico, os dados – apresentados na forma de média \pm erro padrão, em que n corresponde ao número de animais em estudo – foram estudados através de uma análise de variâncias ANOVA de duas entradas com pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Os resultados são apresentados em três fases:

- Na primeira determinaram-se as melhores condições para uma extração eficiente de compostos fenólicos, testando diferentes solventes e tratamentos à amostra.
- Na segunda fase realizou-se a caracterização em compostos fenólicos do melhor extrato que foi aquele administrado aos animais. Sempre que possível, os resultados foram comparados com os reportados na literatura.
- Na terceira fase realizaram-se os ensaios da atividade antioxidante e anti-inflamatória (ensaios *in vivo*) do extrato administrado aos animais.

1. Determinação das condições de extração

1.1. Determinação do teor em fenóis totais

A quantificação de fenóis totais é uma estimativa do conteúdo de todos os compostos pertencentes às subclasses de compostos fenólicos presentes nas amostras. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 12, bem como os teores descritos por outros autores em função do tipo e da concentração da solução extratante utilizada.

Tabela 12 - Teor total de fenóis nos extratos de mirtilo

Extratos	Solução extratante	Tratamento	Resultados obtidos*	Resultados descritos*
1	Metanol:água (80:20 v/v)	ULTRATURRAX	283,79±3,29 ^{ab}	274,48±15,83 Rodrigues et al. (2009)
4		Azoto líquido	379,70±6,15 ^{ab}	
2	Acetona:água (70:30 v/v)	ULTRATURRAX	253,89±8,07 ^{ab}	348,0±34,3 Heinonen et al. (1998)
5		Azoto líquido	170,32±3,83 ^{ab}	
3	Etanol:água (60:40 v/v)	ULTRATURRAX	225,74±7,66 ^{ab}	315,0±70 Medina et al. (2011)
6		Azoto líquido	410,73±8,07 ^{ab}	

*expresso em mg de equivalentes de ácido gálico ± DP/100g de fruto fresco; (a) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo solvente com tratamentos diferentes; (b) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo tratamento da amostra com solventes diferentes.

De acordo com os resultados obtidos, os teores de fenóis totais foram superiores nos extratos 6 e 4. O modo de preparação destes extratos foi comum (utilização de azoto líquido) embora a solução extratante fosse diferente, num caso, extrato 6 foi usada solução etanólica a 60% e no outro, extrato 4, solução metanólica a 80%. Os teores foram respetivamente de $410,73 \pm 8,07$ mg e $379,70 \pm 6,15$ mg de equivalentes de GAE em 100 gramas de fruto. Todos os resultados são considerados estatisticamente diferentes considerando $p < 0,05$, quer para o mesmo solvente fazendo variar os tratamentos, quer para o mesmo tratamento fazendo variar o solvente. Os teores descritos para a acetona 70% e metanol 80% são ligeiramente superiores aos obtidos neste estudo. Estas variações devem-se à grande diversidade de cultivares dentro da mesma espécie (fatores genéticos), aos diversos locais e formas de cultivo, maturação, aos fatores climáticos das diferentes regiões, às condições de conservação e armazenamento, e aos diversos métodos de extração e de análise dos extratos. Relativamente aos teores obtidos com o etanol 60%, vão ao encontro dos reportados na literatura.

O tratamento das amostras foi diferente e com isso os resultados também divergiram, as amostras 1, 2 e 3 foram trituradas no ULTRATURRAX, enquanto as amostras 4, 5 e 6 foram tratadas com azoto líquido, trituradas num almofariz e homogeneizadas com a solução extratante. Nos primeiros três extratos verificou-se que a solução de metanol 80% é o melhor solvente extratante, seguindo-se a acetona 70% e o etanol 60%, respetivamente. O mesmo não se observa nos extratos tratados com azoto líquido, onde o etanol 60% apresenta os melhores resultados, seguindo-se o metanol 80% e a acetona 70%, respetivamente. Neste último grupo de extratos a acetona 70% é o solvente extratante que apresenta os piores resultados, inclusive apresenta teores inferiores aos da amostra 2 triturada no ULTRATURRAX. Um dos possíveis motivos pode ter sido

uma má trituração dos mirtilos após o tratamento com azoto líquido, isto porque alguns autores defendem que a acetona 70% é um dos solventes mais eficaz na extração deste tipo de compostos. Contudo não é consensual, uma vez que outros autores defendem o contrário. Independentemente disso, a diferença entre os teores extraídos com acetona, etanol e metanol não deveriam ser tão diferentes. Os extratos 4 e 6 apresentam teores em compostos fenólicos superiores aos das amostras 1 e 3 respetivamente, conforme previsto, porque alguns autores afirmam que com a utilização de azoto líquido os teores extraídos são superiores.

Quando comparados os teores obtidos neste método com os cromatogramas a 280 nm obtidos por HPLC-DAD, apresentados mais à frente neste trabalho, verifica-se que são maioritariamente são concordantes, existindo pequenas diferenças. A área total do cromatograma do extrato 6 é superior à do extrato 4, tal como seria de se esperar, uma vez que a partir desta técnica o teor do extrato 6 é superior ao do extrato 4. A área total do extrato 3 é superior à do extrato 1, o que não seria de se esperar, uma vez que a partir desta técnica o teor do extrato 1 é superior ao do extrato 3. A área total do cromatograma do extrato 2 é superior à do extrato 5, tal como seria de se esperar, uma vez que a partir desta técnica o teor do extrato 2 é superior ao do extrato 5. Uma possível causa para o observado é o facto das técnicas espectrofotométricas serem mais sensíveis a interferentes que estejam presentes nos extratos. Outra situação é o fato de a 280 nm há interferência das antocianinas que também absorvem, enquanto que para este método não apresentam afinidade.

Na tabela 13 são apresentados teores descritos, por outros autores, em função das diferentes espécies de mirtilos. Os resultados descritos na literatura variam conforme a espécie em estudo, sendo que algumas delas, nomeadamente o *V. myrtillus*, apresentam teores muito superiores aos encontrados no *V. corymbosum*.

Tabela 13 - Teor total de fenóis, obtidos por outros autores, nas diferentes espécies de mirtilos

Espécie	Teores	Autores
<i>V. corymbosum</i>	452,8 mg GAE/100 g	Yuan et al. (2011)
	274 mg GAE/100 g	Wang et al. (2012)
	289,5 mg GAE/100 g	Giovanelli e Buratti (2009)
<i>V. myrtillus</i>	595 mg GAE/100 g	Giovanelli e Buratti (2009)
<i>V. virgatum</i>	331 mg GAE/100 g	You et al. (2011)
<i>V. ashei</i>	510,6 mg GAE/100 g	Yuan et al. (2011)

Medina (2011) desenvolveu um novo método para a quantificação dos fenóis totais a partir da reação com o sal de diazónio *Fast Blue BB*. Os teores obtidos foram muito superiores (1291 mg/100g) comparativamente com os obtidos pelo método *Folin-Ciocalteu* (315 mg/100g). Este novo método é rápido e simples e baseia-se na ligação de compostos fenólicos com o sal de diazónio originando estruturas “azo”. Este acoplamento ocorre em soluções levemente alcalinas onde os compostos fenólicos são convertidos a iões fenóxido, sendo estes muito mais reativos que a estrutura inicial. O sal *Fast Blue BB* contém um grupo diazónio que se liga ao grupo reativo –OH destes fenóis. As principais vantagens, comparativamente com o método *Folin-Ciocalteu* utilizado neste trabalho, estão relacionadas com o facto de não existir interferência de outros compostos antioxidantes e redutores não fenólicos (ácido ascórbico, glicose, frutose, sulfitos) comumente presentes nos frutos. Para além desses compostos, alguns aminoácidos (tirosina e triptofano) e proteínas também reagem com o reagente de *Folin-Ciocalteu* apresentando a coloração azul. Não ignorando estas vantagens, o método *Folin-Ciocalteu* foi utilizado no presente estudo, uma vez que é mais antigo e fiável, todos os parâmetros são conhecidos e estão otimizados, a maioria dos autores utilizam-no demonstrando confiança no mesmo. No futuro, quando existirem mais estudos sobre este novo método transmitindo mais confiança, e quando todos os parâmetros estiverem 100% estudados, será de considerar a sua utilização, uma vez que é mais rápido e apresenta menos custos.

1.2. Determinação do teor em antocianinas totais

Os pigmentos azuis-arroxeados do mirtilo são maioritariamente antocianinas, estas reagem com o bissulfito dando origem a compostos incolores, descorando a solução. A diferença entre as amostras com bissulfito e as amostras de referência sem bissulfito dar-nos-á o teor em antocianinas totais presentes nas amostras. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 14.

Tabela 14- Teor total de antocianinas nos extratos de mirtilo

Extrato	Solvente	Tratamento	Resultados obtidos*
1	Metanol:água (80:20 v/v)	ULTRATURRAX	91,39 ± 3,09 ^{ab}
4		Azoto líquido	161,11 ± 6,41 ^{ab}
2	Acetona:água (70:30 v/v)	ULTRATURRAX	59,81 ± 2,66 ^{cb}
5		Azoto líquido	53,76 ± 2,26 ^{cb}
3	Etanol:água (60:40 v/v)	ULTRATURRAX	77,02 ± 0,86 ^{ab}
6		Azoto líquido	203,52 ± 22,36 ^{ab}

*expresso em mg de equivalentes de cianidina-3-glucósido ± DP/100g de fruto fresco; (a) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo solvente com tratamentos diferentes; (c) diferença estatisticamente não significativa para o mesmo solvente com tratamentos diferentes; (b) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo tratamento da amostra com solventes diferentes.

De acordo com os resultados obtidos, os teores totais de antocianinas foram superiores no extrato 6, 203,52 ± 22,36 mg de equivalentes cianidina-3-glucósido em 100 gramas de fruto, e no extrato 4, 161,11 ± 6,41 mg de equivalentes cianidina-3-glucósido em 100 gramas de fruto, tal como se verificou no método *Folin-Ciocalteu*. Quando comparados os cromatogramas a 527 nm obtidos por HPLC-DAD, apresentados mais à frente neste trabalho, com estes teores verifica-se que são concordantes. A área total do cromatograma do extrato 6 é superior à do extrato 4, e a área total do extrato 1 é ligeiramente superior à do extrato 3, tal como seria de se esperar, uma vez que a partir desta técnica o teor do extrato 1 é superior ao do extrato 3, e o teor do extrato 6 é superior ao do extrato 4. O mesmo se verifica para os extratos 2 e 5, uma vez que em ambas as técnicas os teores são sempre superiores no extrato 2. Os teores são concordantes uma vez que a 527 nm apenas absorvem as antocianinas, tal como neste método, não existindo interferentes.

Todos os resultados são considerados estatisticamente diferentes ($p < 0.05$), quer para o mesmo solvente fazendo variar os tratamentos, quer para o mesmo tratamento fazendo variar o solvente, à exceção dos extratos 2 e 5, onde os teores extraídos com acetona 70% não são significativamente diferentes entre os dois tratamentos.

Os teores obtidos no presente estudo são concordantes com os relatados por outros autores para o fruto inteiro, como demonstra a tabela 15. É possível observar uma variação nos resultados dentro da mesma espécie, uma vez que as características dos frutos estudados são diferentes (locais e formas de cultivo, condições climáticas, data de colheita, maturação, técnicas de armazenamento e conservação, entre outros). Alguns autores determinam estes teores não apenas no fruto inteiro, como no presente estudo, mas também nas diferentes partes do fruto (película e polpa). As antocianinas estão presentes em maior quantidade na película do fruto, daí a sua cor escura, logo os teores encontrados na polpa são muito inferiores. Quando se analisa o fruto inteiro, incluindo polpa e a película, os teores são inferiores aos da película. Um dos motivos para tal ocorrer poderá dever-se à presença de interferentes na polpa que condicionam a análise das mesmas, ou a presença de compostos que em contacto com as antocianinas após trituração do fruto, levem à degradação/dissociação das mesmas.

Pertuzatti et al. (2007) determinaram os teores de antocianinas totais na fruta inteira, película e polpa, e relataram para a variedade Powder Blue valores médios de 256 e 716 mg de equivalentes cianidina-3-glucósido em 100 gramas, para o fruto inteiro e película, respetivamente. Para a variedade Delite apresentou valores médios inferiores, entre 144 e 382,3 mg de equivalentes

cianidina-3-glucósido em 100 gramas para fruto e película, respetivamente. Em relação à polpa, a variedade Delite apresentou os maiores teores de antocianinas, em torno de 80,9 mg de equivalentes cianidina-3-glucósido por 100 gramas, enquanto que os teores foram de 2,7 mg de equivalentes cianidina-3-glucósido em 100 gramas na polpa dos frutos da variedade Powder Blue. Isto deve-se ao fato da polpa dos frutos da variedade Delite possuírem coloração avermelhada, enquanto que os frutos da variedade Powder Blue possuem coloração amarelada.

Tabela 15 - Teores de antocianinas totais, obtidos por outros autores, nas diferentes espécies de mirtilos

Espécie	Teores	Autores
<i>V. corymbosum</i>	326,9 mg cia-3-glu/100 g	Yuan et al. (2011)
	252 mg cia-3-glu/100 g	Wang et al. (2012)
	112,7 mg cia-3-glu/100 g	Giovanelli e Buratti (2009)
	208 mg cia-3-glu/100 g	Moyer et al. (2002)
	484 mg cia-3-glu/100 g	Heinonen et al. (1998)
<i>V. ashei</i>	276,8 mg cia-3-glu/100 g	Yuan et al. (2011)
<i>V. virgatum</i>	182 mg cia-3-glu/100 g	You et al. (2011)
<i>V. myrtilus</i>	337 mg cia-3-glu/100 g	Giovanelli e Buratti (2009)

Heinonen et al. (1998) verificou que os teores de antocianinas totais em amoras e mirtilos foram superiores ao teor médio de fenólicos totais, devido à fraca resposta das antocianinas no ensaio de *Folin-Ciocalteu*. De acordo com Singleton et al. (1973), a resposta das antocianinas neste ensaio é apenas de 0,40 em comparação com as respostas de 1 para o ácido gálico e de 0,99 para a catequina. Assim, comparativamente com as antocianinas, existem outros compostos presentes nestas amostras que têm uma maior contribuição para os resultados do *Folin-Ciocalteu*.

1.3. Determinação do teor em flavonóides totais

Com este método pretende-se a quantificação das diversas subclasses de flavonóides presentes nos extratos de mirtilos, evitando a interferência de outros compostos fenólicos, nomeadamente ácidos fenólicos. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 16.

Tabela 16- Teor total de flavonóides nos extratos de mirtilo

Extrato	Solvente	Tratamento	Resultados obtidos*
1	Metanol:água	ULTRATURRAX	114,7 ± 1,03 ^{ab}
4	(80:20 v/v)	Azoto líquido	169,6 ± 2,10 ^{ab}
2	Acetona:água	ULTRATURRAX	100,8 ± 4,27 ^{ab}
5	(70:30 v/v)	Azoto líquido	82,5 ± 2,23 ^{ab}
3	Etanol:água	ULTRATURRAX	95,4 ± 1,57 ^{ab}
6	(60:40 v/v)	Azoto líquido	153,9 ± 2,17 ^{ab}

*expresso em mg de equivalentes de catequina ± DP/100g de fruto fresco; (a) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo solvente com tratamentos diferentes; (b) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo tratamento da amostra com solventes diferentes.

Estes resultados foram ligeiramente diferentes, comparativamente ao que se sucedia no método *Folin-Ciocalteu* e no método bissulfito, uma vez que o extrato com o teor mais elevado é o 4, enquanto que nas outras técnicas era o extrato 6. Tal se verifica porque os compostos pertencentes à classe dos flavonóides têm mais afinidade com o metanol do que com qualquer outro solvente. A extração com acetona continua a apresentar os teores mais baixos. Igualmente ao que se verificou nos métodos anteriores, os extratos tratados com azoto líquido apresentam teores mais elevados do que os extratos triturados no ULTRATURRAX, à exceção do extrato 5 (acetona 70%). Quando comparados os cromatogramas a 360 nm obtidos por HPLC-DAD, apresentados mais à frente neste trabalho, com estes teores verificam-se algumas diferenças. A área total do cromatograma do extrato 3 e 6 é ligeiramente superior à do extrato 1 e 4 respetivamente, o que não seria de se esperar, uma vez que a partir desta técnica o teor do extrato 1 é superior ao do extrato 3, e o extrato 4 é superior ao do extrato 6. Tal como no método Folin-Ciocalteu para os fenóis totais,

uma possível causa para o observado é o facto das técnicas espectrofotométricas serem mais sensíveis a interferentes que estejam presentes nos extratos. Outra situação é o fato de a 360 nm existir interferência das antocianinas, uma vez que estas também absorvem a este comprimento de onda.

Todos os resultados são considerados estatisticamente diferentes considerando $p < 0.05$, quer para o mesmo solvente fazendo variar os tratamentos, quer para o mesmo tratamento fazendo variar o solvente. Os resultados obtidos são concordantes com os já relatados por outros autores. É possível observar uma variação nos resultados dentro da mesma espécie, uma vez que as características dos frutos estudados são diferentes (locais e formas de cultivo, condições climáticas, data de colheita, maturação, técnicas de armazenamento e conservação, entre outros). Na tabela 17 são apresentados os teores descritos em função das diferentes espécies de mirtilos estudada.

Tabela 17- teores de flavonoides, obtidos por outros autores, nas diferentes espécies de mirtilos

Espécie	Teores	Autores
<i>Vaccinium corymbosum</i>	112 mg catequina/100 g	Sinelli et al. (2008)
	160 mg catequina/100 g	Hwang et al. (2014)
<i>Vaccinium myrtillus</i>	153,1 mg catequina/ L	Faria et al. (2005)
<i>Vaccinium arctostaphylos</i>	467 mg catequina/100 g	Cebeci et al. (2013)

1.4. Determinação do teor em taninos hidrolisáveis

Neste método pretende-se a quantificação dos galhotaninos e elagitaninos presentes nos extratos de mirtilos. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 18.

Tabela 18 - Teor de taninos hidrolisados nos extratos de mirtilo

Extrato	Solvente	Tratamento	Resultados obtidos*
1	Metanol:água	ULTRATURRAX	836,4 ± 5,74 _{ab}
4	(80:20 v/v)	Azoto líquido	877,75 ± 6,10 _{ab}
2	Acetona:água	ULTRATURRAX	483,0 ± 9,58 _{ab}
5	(70:30 v/v)	Azoto líquido	393,54 ± 5,83 _{ab}
3	Etanol:água	ULTRATURRAX	435,08 ± 2,70 _{ab}
6	(60:40 v/v)	Azoto líquido	1404,7 ± 2,63 _{ab}

*expresso em mg de equivalentes de ácido tânico ± DP/100g de fruto fresco; (a) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo solvente com tratamentos diferentes; (b) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo tratamento da amostra com solventes diferentes.

De acordo com os resultados obtidos, os teores totais de taninos hidrolisáveis foram superiores no extrato 6, 1404,7 ± 2,63 mg de equivalentes de ácido tânico em 100 gramas de fruto, e no extrato 4, 877,75 ± 6,10 mg de equivalentes de ácido tânico em 100 gramas de fruto, tal como se verificou para os fenóis totais e antocianinas totais. Todos os resultados são considerados estatisticamente diferentes considerando $p < 0.05$, quer para o mesmo solvente fazendo variar os tratamentos, quer para o mesmo tratamento fazendo variar o solvente.

Os resultados obtidos são muito superiores comparativamente com os já relatados por outros autores, contudo não foi possível encontrar muitos mais estudos sobre estes teores nos mirtilos. Daniel et al. (1989) relatou teores para taninos elágicos de 120 mg em 100 gramas de fruto, e Pertuazatti et al. (2007) relatou, para taninos hidrolisáveis totais, teores de 266 mg em 100 gramas de fruto. Estas diferenças nos teores obtidos e relatados devem-se à grande diversidade de cultivares dentro da mesma espécie (fatores genéticos), aos diversos locais e formas de cultivo, maturação, aos fatores climáticos das diferentes regiões, às condições de conservação e armazenamento, e aos diversos métodos de extração e de análise dos extratos. A escassez de resultados deve-se ao facto de a maioria dos autores fazer a quantificação individual dos

compostos por cromatografia e raramente quantificam o teor total de taninos hidrolisáveis presentes nos extratos de mirtilo.

1.5. Determinação do teor em procianidinas

As procianidinas pertencem ao grupo dos taninos condensados, como tal o método utilizado permite a quantificação dos teores totais destes compostos. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 19.

Tabela 19 - Teor de procianidinas nas amostras de mirtilo

Extrato	Solvente	Tratamento	Resultados obtidos*
1	Metanol:água	ULTRATURRAX	157,8 ± 20,6 _{ab}
4	(80:20 v/v)	Azoto líquido	230,8 ± 23 _{ab}
2	Acetona:água	ULTRATURRAX	93,3 ± 8,87 _{cb}
5	(70:30 v/v)	Azoto líquido	93,06 ± 10,95 _{cb}
3	Etanol:água	ULTRATURRAX	149,6 ± 12,8 _{ab}
6	(60:40 v/v)	Azoto líquido	262,1 ± 27,7 _{ab}

*expresso em mg de equivalentes de catequina ± DP/100g de fruto fresco; (a) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo solvente com tratamentos diferentes; (c) diferença estatisticamente não significativa para o mesmo solvente com tratamentos diferentes; (b) diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o mesmo tratamento da amostra com solventes diferentes.

De acordo com os resultados obtidos, os teores totais de procianidinas foram superiores no extrato 6, 262,1 mg de equivalentes catequina em 100 gramas de fruto, e no extrato 4, 230,8 mg de equivalentes catequina em 100 gramas de fruto, tal como se verificou para os fenóis totais, antocianinas totais e taninos hidrolisáveis. Todos os resultados são considerados estatisticamente diferentes considerando $p < 0.05$, quer para o mesmo solvente fazendo variar os tratamentos, quer para o mesmo tratamento fazendo variar o solvente, à exceção dos extratos 2 e 5, onde os teores extraídos com acetona 70% não são significativamente diferentes entre os dois tratamentos.

Os resultados obtidos, maioritariamente, vão ao encontro dos já relatados na literatura. Gu et al. (2004) relatou teores médios de 179,89 mg em 100 gramas de fruto para a espécie *V. corymbosum*, e 331,9 mg em 100 gramas de fruto para *V. angustifolium*. Cheng et al. (2003) relatou teores médios para procianidinas extraíveis de 434 mg em 100 gramas de fruto, e teores médios para procianidinas não extraíveis de 1113 mg em 100 gramas de fruto. A grande parte das procianidinas não é extraída da matriz vegetal devido à sua complexidade. Cheng analisou os resíduos do extrato para conseguir quantificar as procianidinas não extraídas, daí os teores relatados serem muito superiores aos de Gu et al. (2004). Uma vez que tal não foi feito no presente trabalho, os teores obtidos correspondem à porção de procianidinas extraídas. Gu et al. (2002) fracionou o extrato para conseguir extrair o teor total de procianidinas, obtendo teores médios de 1999 mg em 100 gramas de fruto. Relativamente às técnicas utilizadas, Cheng determinou o teor a partir do mesmo método utilizado no presente estudo, enquanto que Gu utilizou a técnica cromatográfica HPLC. As variações entre os resultados devem-se à grande diversidade de espécies (fatores genéticos), aos diversos locais e formas de cultivo, à maturação, aos fatores climáticos das diferentes regiões, às condições de conservação e armazenamento, e aos diversos métodos de extração e de análise dos extratos já referidos.

1.6. Discussão das condições utilizadas para a preparação dos extratos

Neste trabalho foram testadas diferentes soluções extratantes e modos de preparação das amostras. As soluções foram escolhidas de acordo com dados apresentados na literatura por outros autores como sendo as que apresentavam maior eficiência na extração de compostos fenólicos, comparativamente com outros solventes que não foram testados neste estudo. Na escolha do tratamento aplicado às amostras, também foram escolhidas as duas técnicas que reuniram o maior

consenso na literatura como sendo as mais eficientes na extração destes compostos nas amostras de mirtilo. O mesmo critério foi utilizado na escolha do tipo de conservação aplicado às amostras, na escolha das concentrações das soluções extratantes, e na escolha da temperatura e tempo de extração. Uma vez que neste estudo não se testaram estes parâmetros, foram utilizados os resultados considerados mais eficazes na literatura. Com estes ensaios pretendia-se avaliar, qual a solução e o tratamento que apresentava melhor capacidade de extração.

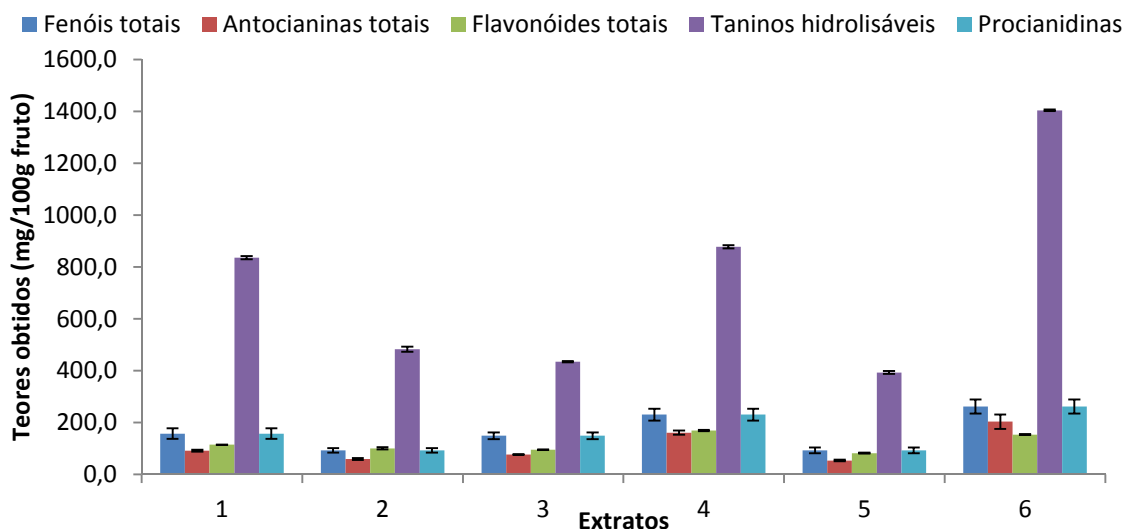


Figura 27 – Resultados obtidos nas diversas técnicas espectrofotométricas nos diferentes extratos

Relativamente à conservação das amostras, Srivastava et al. (2007), Oancea et al. (2012) e Scibisz et al. (2007) avaliaram o efeito da congelação e da refrigeração dos mirtilos nos teores de compostos fenólicos, e verificaram que na congelação a perda não foi significativa, enquanto que na refrigeração a perda já foi superior. Verificaram também que comparativamente com a fruta fresca, os mirtilos congelados apresentavam teores superiores. Um dos motivos para tal se verificar, é a possível perda de água ao longo do tempo nos frutos frescos e refrigerados, arrastando alguns compostos. Como tal, os mirtilos utilizados no presente estudo foram congelados após a colheita e utilizados para as análises posteriores.

Quanto ao tratamento dado às amostras, é visível uma melhor extração quando é adicionado aos frutos azoto líquido e em seguida, a sua trituração até a obtenção de um pó, que depois é dissolvido na solução extratante. Quando se adiciona o azoto líquido aos frutos, estes congelam em segundos e ao serem triturados no almofariz vão transformar-se num pó. Este ao ser dissolvido no solvente extratante garante que a maioria dos compostos que estavam presentes no fruto está agora presentes no extrato. A trituração com o ultra-Turrax não é tão eficiente, uma vez que algumas partes do fruto, nomeadamente película e sementes, não são totalmente trituradas, retendo parte dos compostos. A escolha destes dois tratamentos foi com base em alguns autores que defendem a elevada eficiência deste dois procedimentos, sendo que o azoto líquido apresenta teores quase sempre superiores, tal como observado neste estudo (Barnes et al., 2009; Moyer et al., 2002; You et al., 2011).

No que diz respeito às soluções extratantes utilizadas, Barnes et al. (2009) verificou que, regra geral, o etanol, a acetona, e o metanol são, respetivamente, os melhores solventes para a extração de compostos fenólicos em amostras de mirtilo. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o etanol apresentou melhor extração, seguindo-se o metanol e por fim a acetona, o que vai ao encontro do reportado por Naczki e Shahidi (2004) e Hayouni et al. (2007). Quanto à concentração destes solventes, é relativamente consensual, as soluções etanólicas (60:40; v/v) e metanólicas (80:20; v/v) apresentam maioritariamente os teores mais elevados, tal como se verificou no presente estudo (Aguar et al., 2007; Cacace e Mazza, 2003; Chan et al., 2009; Nepote et al., 2005;

Oancea et al., 2012; Spagolla et al., 2009). Spagolla et al. (2009) demonstrou que as soluções metanólica (40:60; v/v) e etanólica (80:20; v/v) apresentam pouca eficiência na extração destes compostos, por tanto, embora o etanol e o metanol apresentem uma boa capacidade de extração, nem todas as proporções de etanol em água são capazes de extrair o teor máximo de compostos fenólicos contidos nas amostras.

De acordo com Heinonen et al. (1998) e Vizzotto et al. (2009), o uso de acetona proporcionou os melhores resultados, exatamente o contrário do que foi obtido no presente estudo. Provavelmente tal se verificou devido às diferenças no procedimento utilizado por estes autores. A acidificação dos solventes geralmente aumenta o seu poder para extrair compostos fenólicos, nomeadamente as antocianinas que são mais estáveis a pH baixo. Contudo, os resultados obtidos por Vizzotto et al. (2009) não foram estatisticamente significativos para os solventes acidificados. O mesmo autor também testou a solução metanol:acetona, com o intuito de que o metanol iria extrair compostos mais polares e a acetona compostos menos polares, contudo os teores obtidos continuam a ser inferiores ao da solução de acetona (70%).

Os compostos fenólicos no mirtilo apresentam características moderadamente polares, logo a eficiência da extração destes compostos requer o uso de solventes com esta característica, nomeadamente o etanol e metanol, enquanto que a acetona apresenta afinidade para compostos menos polares (Hutabarat et al., 2000; Liu et al., 2000). Chan et al. (2009) sugerem que solventes com alta polaridade, como a água, e solventes com polaridade muito baixa, ou apolares, não são bons extratores. Sempre que a diferença entre os solventes não for estatisticamente significativa é preferível a utilização de etanol, uma vez que este é classificado como *GRAS* (reconhecido como seguro), tendo em vista a aplicação na área alimentar (Chan et al., 2009).

Relativamente ao tempo da duração da extração, Chan et al. (2009) e Oancea et al. (2012) defendem que entre os 60 e os 180 minutos se obtém-se uma extração mais eficiente, uma vez que o teor em fenóis é mais elevado, contudo os teores não aumentam significativamente entre eles neste intervalo de tempo. Passados os 180 minutos o teor começa a diminuir gradualmente. Este fenómeno é explicado pela segunda lei de difusão de Fick, onde o equilíbrio final entre as concentrações do soluto na matriz sólida e o solvente é atingido após um certo período de tempo, por isso, uma extração muito longa não garante um teor superior em antioxidantes fenólicos. Além disso, o processo de extração prolongada pode levar a oxidação dos compostos fenólicos, devido à luz ou exposição ao oxigénio (Silva et al., 2007). Como tal, baseando a decisão nestes resultados, para o presente estudo a extração teve a duração total de ± 90 minutos.

Quanto à temperatura ideal para a extração máxima destes compostos, Chan et al. (2009) e Oancea et al. (2012) constataram que entre os 25 e os 40°C há um aumento do teor de fenóis e a temperaturas mais elevadas há um declínio nos teores. É importante ter em conta que as temperaturas elevadas podem promover a destruição de compostos que já foram extraídos a temperaturas mais baixas, ou até mesmo de compostos que ainda permaneçam na matriz vegetal. Como tal, a temperatura utilizada para extração no presente estudo foi aproximadamente de 30°C durante o banho de ultrassons e temperatura ambiente ($\pm 21^\circ\text{C}$) durante o resto do procedimento.

2. Caracterização dos compostos fenólicos no extrato de mirtilo a administrar aos animais

Como já mencionado anteriormente, a extração mais eficiente foi obtida no extrato 6, onde se utilizou a solução extratante constituída por etanol:água (60/40 v/v) e o tratamento com azoto líquido (procedimento descrito no capítulo dos métodos, ponto 2.1.2.) Como tal, para a preparação do extrato dos animais utilizou-se o mesmo procedimento. Na tabela 20 são apresentados dois extratos, o concentrado, preparado inicialmente, e o diluído (1:2), administrado aos animais; e os teores obtidos em mg/mL de extrato e mg/100 gramas de fruto.

Tabela 20 – Resultados da caracterização em compostos fenólicos do extrato administrado aos animais.

	Teores obtidos			
	Extrato concentrado		Extrato animais	
Fenóis totais	3,54±0,1 (mg eq. GAE/ml ext.)	354,14±9,58 (mg/100g fruto)	2,37±0,03 (mg eq. GAE/ml ext.)	236,9±3,40 (mg/100g fruto)
Antocianinas totais	1,27±0,16 (mg eq. Cia-3-glu/ml ext.)	127,2±16,07 (mg/100g fruto)	0,58±0,02 (mg eq. Cia-3-glu/ml ext.)	58,61±1,99 (mg/100g fruto)
Flavonóides totais	1,13±0,02 (mg eq. Catequina/ml ext.)	113,17±2,2 (mg/100g fruto)	0,47±0,02 (mg eq. Catequina/ml ext.)	47,35±2,24 (mg/100g fruto)
Taninos hidrolisáveis	7,77±0,15 (mg eq. Ácido tânico/ml extr.)	777±15,41 (mg/100g fruto)	2,76±0,04 (mg eq. Ácido tânico/ml extr.)	276±4,63 (mg/100g fruto)
Procianidinas totais	2,26±0,3 (mg eq. catequina/ml extr.)	225,97±30,64 (mg/100g fruto)	1,17±0,02 (mg eq. catequina/ml extr.)	116,67±2,53 (mg/100g fruto)

Os teores são apresentados em mg/mL extrato e mg/100 gramas fruto para ser possível a comparação com os dados presentes na literatura (figura 21). Os teores obtidos são comparáveis com os descritos por outros autores nas amostras de mirtilo, para as respectivas técnicas, tal como tinha sido discutido anteriormente nas diversas técnicas.

Tabela 21 – Teores descritos na literatura para os extratos de mirtilo

	Teores descritos	Autores
Fenóis totais	289,5 (mg/100g fruto)	Giovanelli e Buratti (2009)
Antocianinas totais	112,7 (mg/100g fruto)	
Flavonóides totais	112,0 (mg/100g fruto)	Sinelli et al. (2008)
Taninos hidrolisáveis	266,0 (mg/100g fruto)	Pertuazatti et al. (2007)
Procianidinas totais	179,8 (mg/100g fruto)	Gonçalves et al. (2007)

3. Caracterização da composição fenólica por HPLC-DAD-ED e LC-ESI-MS/MS

As técnicas cromatográficas aplicadas à análise de compostos fenólicos permitem a separação, identificação e quantificação dos compostos individualmente, em comparação com os respetivos padrões. Os perfis cromatográficos, a 280 nm, dos diferentes extratos preparados apresentam-se na figura 28. No anexo 6 encontram-se os cromatogramas a 360 e 527 nm.

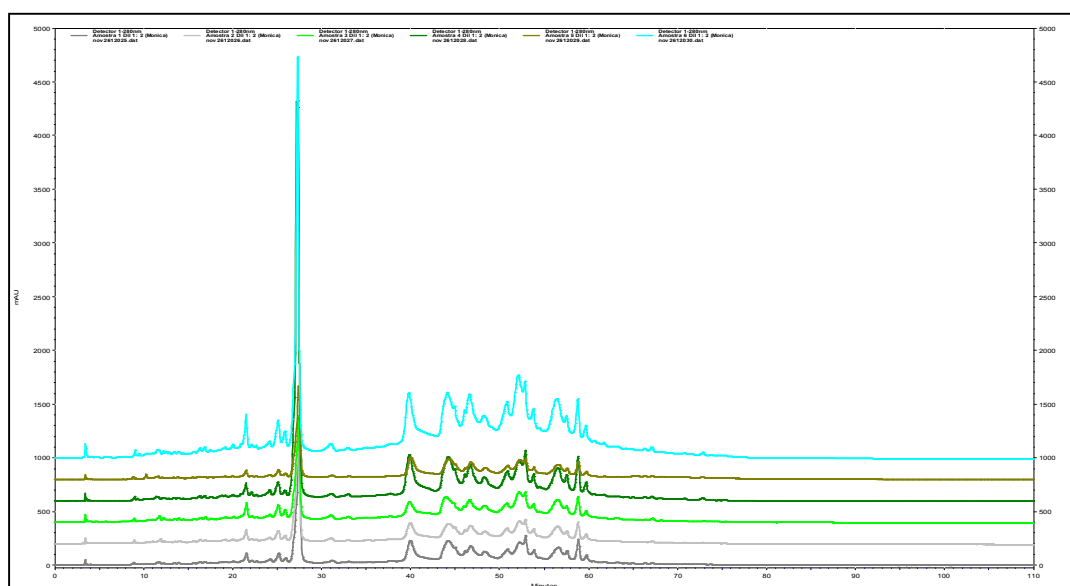


Figura 28- Perfis cromatográficos dos extratos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, diluídos 1:2, aos 280nm

Da observação dos cromatogramas pode concluir-se que a extração mais eficiente ocorreu no extrato 6, uma vez que os picos são maiores, contrariamente ao que aconteceu no extrato 5 que mostrou ser o que apresentava picos cromatográficos mais pequenos. Estes resultados são concordantes com os obtidos nas outras técnicas espectrofotométricas quantitativas, onde o extrato 6 maioritariamente apresentou os melhores resultados, e o extrato 5 os piores resultados.

A partir das áreas totais dos cromatogramas aos diferentes comprimentos de onda (anexo 7), foi possível determinar a correlação (R^2) entre estes resultados e os teores obtidos nas técnicas espectrofotométricas, estes são apresentados na tabela 22. Os gráficos com as correlações são apresentados no anexo 7. A correlação entre estas técnicas é superior para as antocianinas, demonstrando que há uma maior concordância nos resultados obtidos, comparativamente com as outras técnicas. Contrariamente, para os flavonóides a correlação é a mais baixa, demonstrando que os resultados obtidos nestas técnicas são menos concordantes. Tal poderá ser explicado uma vez que a 527 nm (HPLC-DAD) apenas absorvem as antocianinas, não havendo interferência de mais nenhum composto. O mesmo não se verifica a 280 e 360 nm (HPLC-DAD), uma vez que a estes comprimentos de onda as antocianinas também absorvem, interferindo com o resultado de outros compostos. Daí os teores obtidos por HPLC-DAD serem superiores aos obtidos pelas técnicas espectrofotométricas.

Tabela 22 – Correlação entre os teores de fenóis, flavonóides e antocianinas totais com as áreas totais dos cromatogramas a 280, 360 e 527 nm, respetivamente.

	Correlação (R^2)
Fenóis totais vrs. Área total (280nm)	0.73
Flavonóides totais vrs. Área total (360nm)	0.63
Antocianinas totais vrs. Área total (527nm)	0.94

3.1. Identificação dos compostos fenólicos no extrato de mirtilo

A identificação dos compostos teve várias fases: 1. comparou-se o perfil cromatográfico do extrato com os cromatogramas de misturas de padrões; 2. compararam-se os espectros de absorção dos picos com o do padrão respetivo; 3. fez-se a sobrecarga dos padrões na amostra. As soluções das misturas correspondem a alguns dos padrões (tabela 23) descritos na literatura como estando presentes no mirtilo.

Tabela 23 – Composição das misturas de padrões e os respetivos tempos de retenção (t_r)

Pico	t_r (min)	Padrão (20ppm)	Mistura
1	8,78	Arbutina	2
2	10,61	Ácido gálico	3
3	15,29	Ácido protocatechuico	4
4	20,47	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	3
5	23,65	Catequina	2
6	25,34	Ácido vanílico	1
7	26,72	Ácido clorogénico	2
8	27,44	Ácido cafeico	4
9	34,42	Epicatequina	4
10	38,52	Ácido <i>p</i> -cumárico	4
11	44,26	Ácido ferúlico	1
12	44,56	Cianidina-3-glucósido	2
13	46,63	Cianidina-3-rutinósido	1
14	50,70	Peonidina-3-glucósido	2
15	52,83	Quercetina-3-glucósido	3
16	57,64	Quercetina-3-ramnósido	3
17	57,76	Canferol-3-glucósido + Floridzina	1
18	58,36	Isoramnetina-3-rutinósido	4
19	58,40	Miricetina	2

20	59,29	Isoramnetina-3-glucósido	4
21	77,73	Apigenina	2
22	80,91	Isoramnetina	3

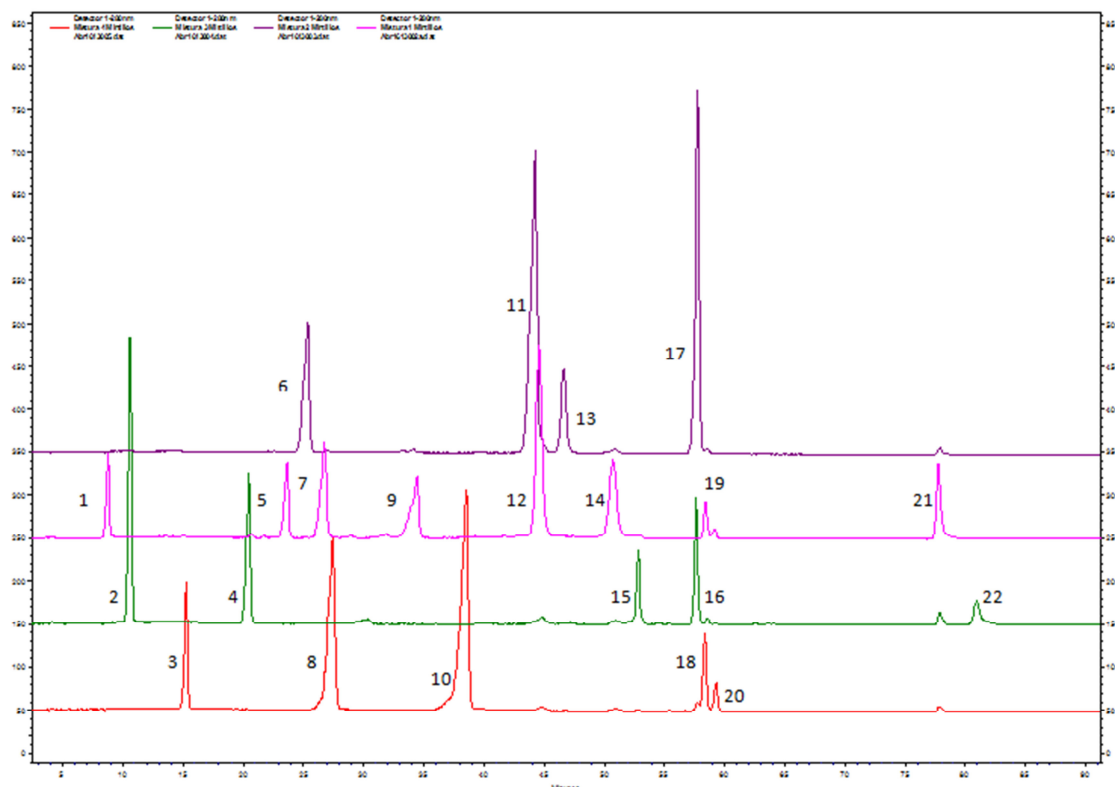


Figura 29 - Sobreposição dos cromatogramas das misturas de padrões 1, 2, 3 e 4 (de cima para baixo) aos 280 nm

A amostra foi analisada aos comprimentos de onda característicos dos principais grupos de fenólicos, uma vez que a partir da absorção máxima é possível ter uma ideia da classe de um composto (anexo 8). Os cromatogramas apresentados nas figuras 30, 31, 32 e 33 ilustram as comparações entre os perfis cromatográficos a 280 nm e a outro comprimento de onda específico de uma classe. Os ácidos fenólicos hidroxibenzoicos apresentam um máximo de absorção entre 235-325 nm, portanto na figura 30 comparou-se o perfil cromatográfico a 280 e 254 nm. Os ácidos fenólicos hidroxicinâmicos apresentam dois máximos de absorção entre 225-235 nm e 290-330 nm, logo na figura 31 comparou-se o perfil cromatográfico a 280 e 320 nm. Os flavonóides apresentam dois máximos de absorção entre 240-280 nm e 300-380 nm, logo na figura 32 comparou-se o perfil cromatográfico a 280 e 360 nm. As antocianinas apresentam dois máximos de absorção entre 274-278 nm e 517-528 nm, logo na figura 33 comparou-se o perfil a 280 e 527 nm.

A sobreposição dos cromatogramas a 280 e 254 nm evidenciou os ácidos hidroxibenzoicos com os tempos de retenção de 8,59; 9,97; 10,61; 11,31; 13,29; 16,90 e 18,50 minutos (figura 30). Estes apresentaram absorção máxima entre os 235 e 325nm, comprimento de onda característico desta classe. Apenas foi possível a identificação do ácido gálico aos 10,61 minutos. Os flavan-3-óis (família das catequinas) e as proantocianidinas apresentam absorção máxima aos 280 e \pm 230 nm. A partir do espectro de absorção característico desta classe, foi possível identificar a catequina aos 23,40 minutos.

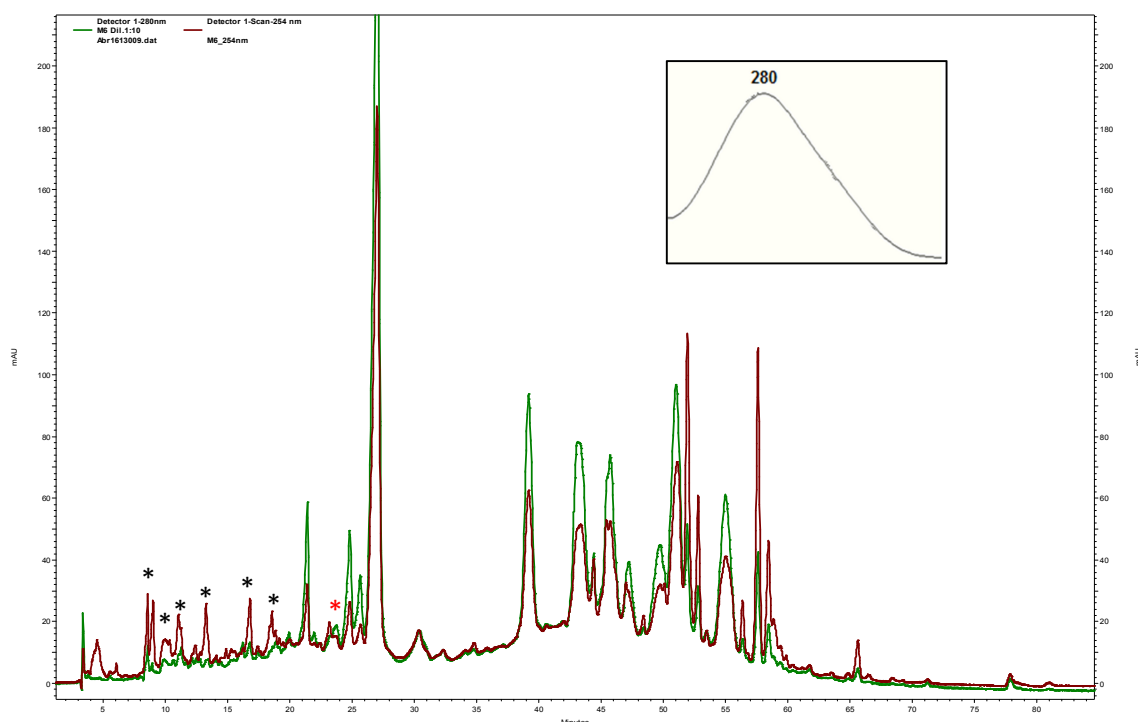


Figura 30 - Sobreposição dos cromatogramas (HPLC-DAD-ED) a 280nm (a verde) e 254nm (a castanho), e o espectro de absorção UV do ácido gálico. (* Ácidos hidroxibenzoicos * Catequina)

Com a sobreposição dos cromatogramas a 280 e 320 nm evidenciaram-se os ácidos hidroxicinâmicos aos tempos de retenção de 21,20; 24,80; 25,60; 27,03; 30,60; 32,30; 44,40 e 45,40 minutos (figura 31). Estes apresentaram absorção máxima entre os 290 e 330 nm, mas também um outro pico entre os 225 e 235 nm, comprimento de onda característico desta classe. Apenas foi possível a identificação do ácido clorogénico aos 27,03 minutos e do ácido ferúlico aos 45,4 minutos.

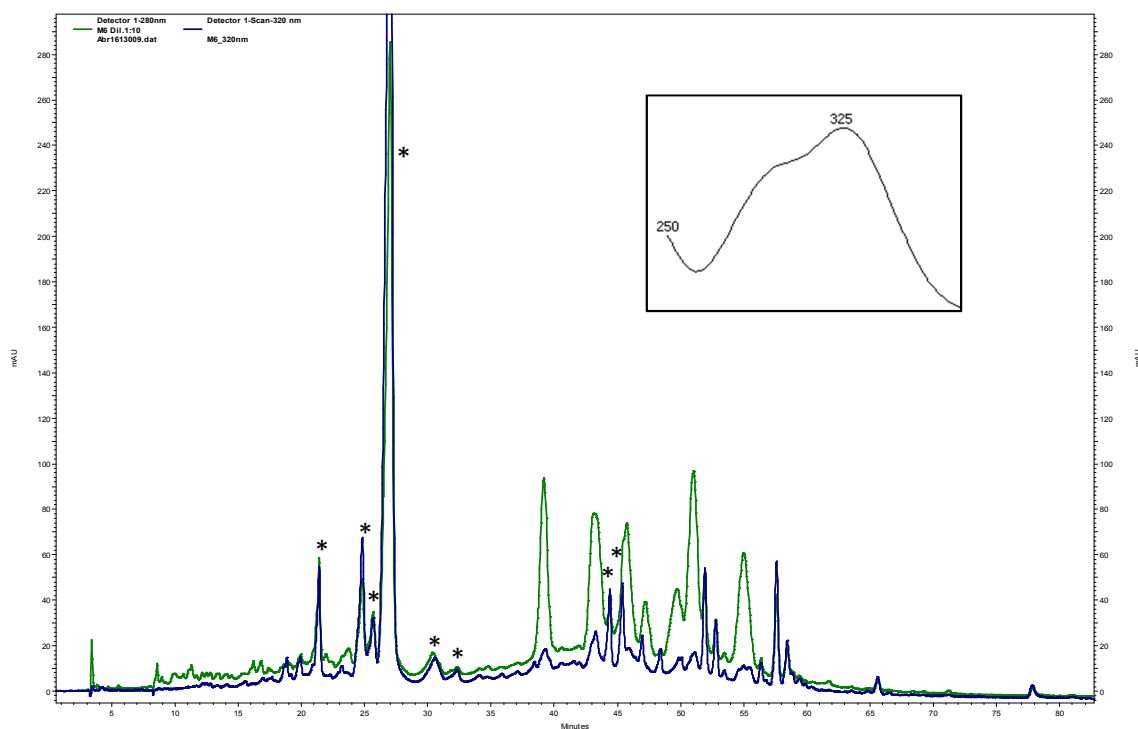


Figura 31 - Sobreposição dos cromatogramas (HPLC-DAD-ED) a 280nm (verde) e 320nm (azul), e o espectro de absorção UV do ácido clorogénico. (* Ácidos hidroxicinâmicos)

Com a sobreposição dos cromatogramas a 280 e 360 nm foi possível determinar os flavonóis com os tempos de retenção de 48,50; 52,80; 56,30; 57,58; 58,44; 59,43; 65,65 e 77,85 minutos

(figura 32). Estes apresentaram uma absorção máxima entre os 300 e 380 nm e um outro pico entre 240 e 280 nm, comprimento de onda caraterístico desta classe. Apenas foi possível a identificação da quercetina-3-glucósido aos 52,8 minutos, a quercetina-3-ramnósido e o canferol-3-glucósido aos 57,60 minutos, isoramnetina-3-rutinósido aos 58,44 minutos e a isoramnetina-3-glucósido aos 61,19 minutos.

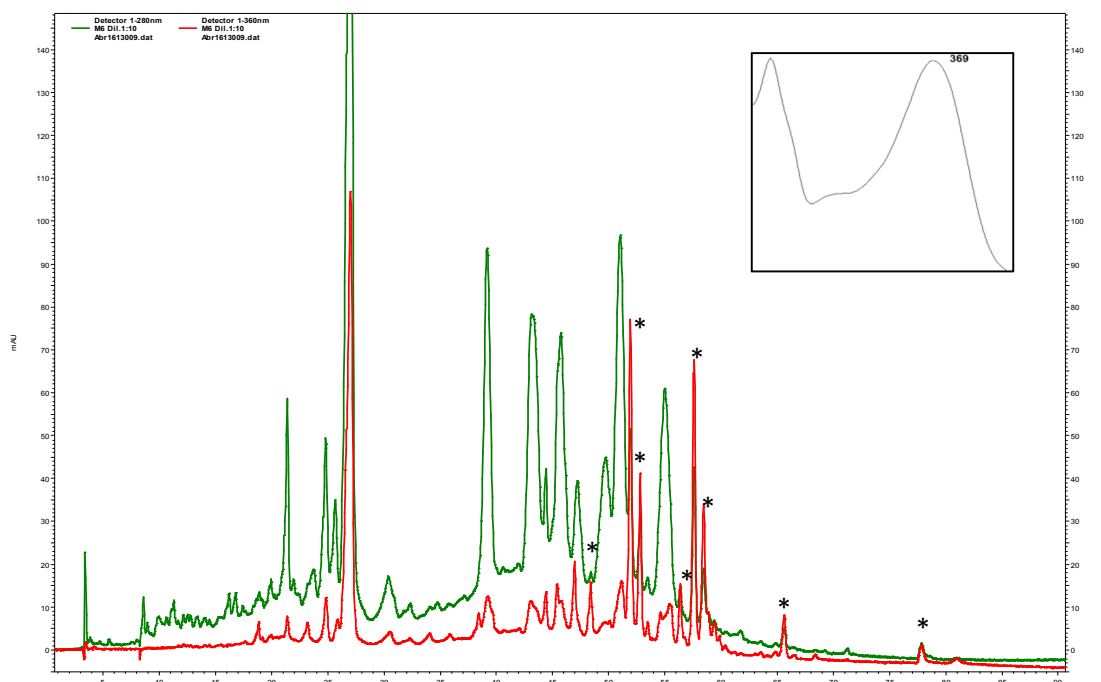


Figura 32 - Sobreposição dos cromatogramas (HPLC-DAD-ED) a 280nm (verde) e 360nm (vermelho), e o espectro de absorção UV da quercetina-3-glucósido. (* Flavonóis)

Com a sobreposição dos cromatogramas a 280 e 527 nm foi possível determinar as antocianinas com os tempos de retenção de 39,20; 43,03; 43,60; 45,77; 47,23; 49,65; 51,00 e 55,01 minutos (figura 33). Estes compostos apresentaram máximos de absorção entre os 525 e 528 nm, e um outro pico entre os 274 e 276 nm, comprimento de onda máximo caraterístico desta classe. Apenas foi possível a identificação da peonidina-3-glucósido aos 52 minutos.

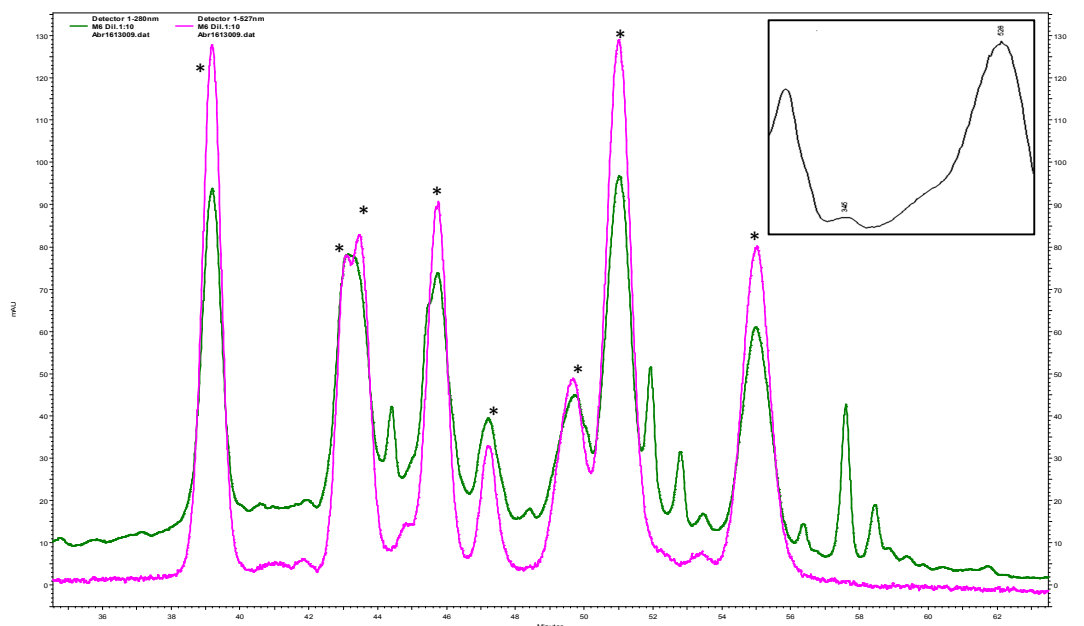


Figura 33- Sobreposição dos cromatogramas (HPLC-DAD) a 280nm (verde) e 527nm (rosa), e o espectro de absorção UV da peonidina-3-glucósido. (* Antocianinas).

A utilização do equipamento de LC-ESI-MS/MS permitiu ajudar na identificação dos compostos a partir das massas moleculares dos iões. Na figura 34 apresenta-se o cromatograma correspondente ao extrato de mirtilo preparado para os animais.

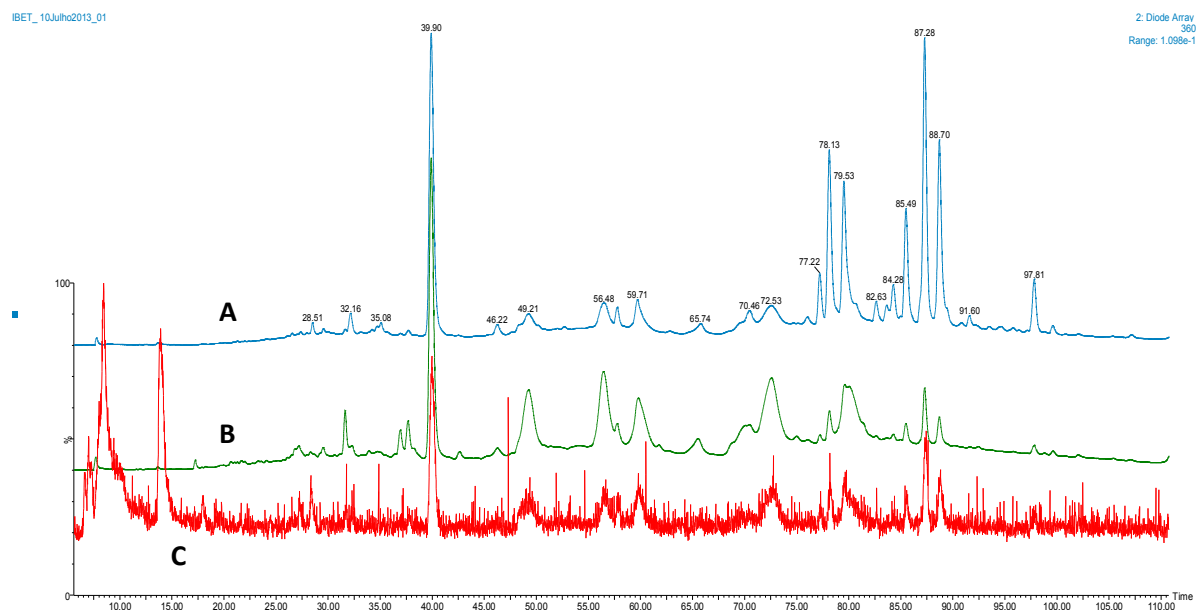


Figura 34 - Sobreposição dos cromatogramas em modo *Scan* (–) (C) (varrimento entre m/z 50-1500) e DAD a 280 (B) e 360 (A) nm correspondentes à análise por LC-MS/MS do extrato de mirtilo para os animais

Pesquisaram-se os iões já reportados na literatura para as amostras de mirtilos. Na figura 35 está representado o espectro de massa da peonidina-3-glucósido.

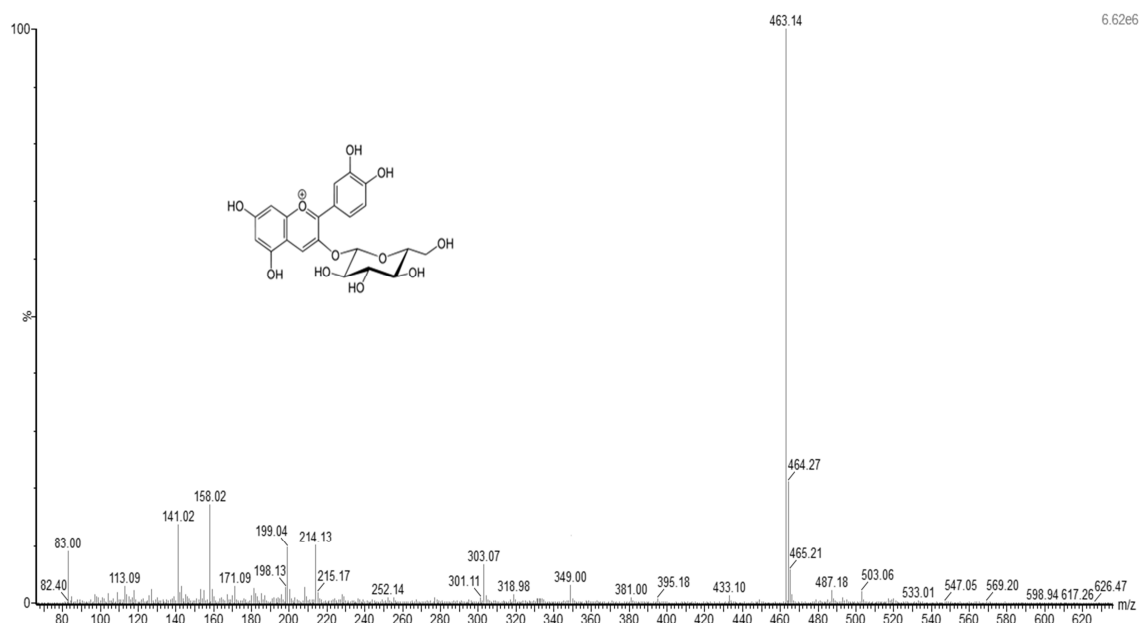


Figura 35 - Espectro do pico ao t_r de 69,87 minutos que corresponde à peonidina-3-glucósido (ião molecular m/z 463)

Os iões mais intensos foram fragmentados no modo *DaughterScan* de forma a obter-se mais informação estrutural sobre as espécies em questão. Os fragmentos são característicos de cada composto e permitem uma identificação inequívoca. Na figura 36 é apresentado o fragmento característico da peonidina-3-glucósido.

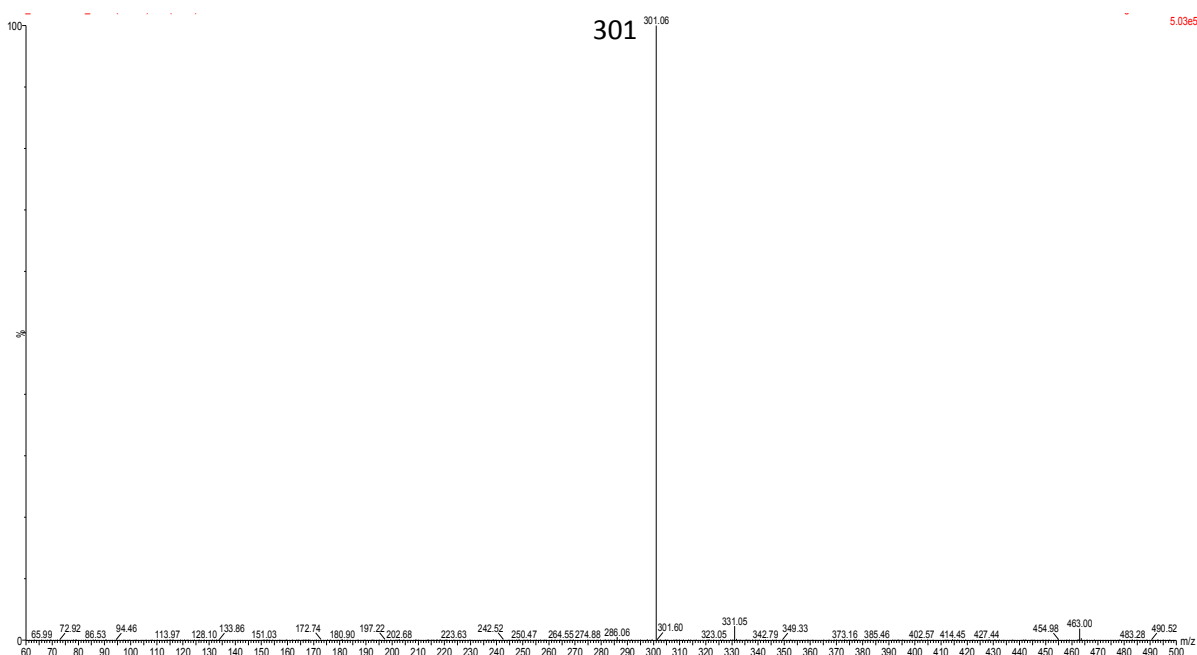


Figura 36- Espectro de MS/MS do ião m/z 463

Os compostos fenólicos identificados no extrato são apresentados na tabela 24, juntamente com os tempos de retenção, comprimentos de onda de absorção máxima, ião molecular e os respectivos fragmentos. A ordem de eluição e a fragmentação estão de acordo com o reportado na literatura por inúmeros autores, nomeadamente Belitz e Grosch (2009), Gavrilova et al. (2011), Kalt e McDonald (1996), Mattila et al. (2006), Moze et al. (2011), Petkovsek et al. (2012) e Vrhovsek et al. (2012).

Tabela 24 – Compostos presentes no extrato de mirtilos, identificados por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS

Pico	TR (min)	λ max	[M-H] ⁻ (m/z)	[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	Nome composto
1	8.18	225	191	-	85	Ácido quínico
2	9.41	241	133	-		Ácido málico
3	12.97	278	191	-	111	Ácido cítrico
3	14.11	278	173	-	111	Ácido Chiquímico
4	17.99	228	389	-	227	Resveratrol-3-glucósido*
6	27.16	278	315			N.I
7	31.63	314	341	-	179, 161	Ácido cafeico-4-glucósido
8	32.47	244;281	577	-	407	Procianidinas Dímeros B
9	36.97	320	355	-	193	Ácido ferulico-4-glucósido
9	37.21	287	289	-	245	Catequina
10	37.63	314	341	-	179, 161	Ácido cafeico-3-glucósido
11	39.10	325	353	-	191	Ácido clorogénico
12	42.61	322	179	-	135	Ácido cafeico
13	46.67	320	355	-	193	Ácido ferulico-3-glucósido
14	49.09	525	463	465	303	Delfinidina-3-galactósido Delfinidina-3-glucósido
15	56.48	524	447	449	287	Cianidina-3-galactósido Cianidina-3-glucósido
15	56.48	524	433	435	303	Delfinidina-3-arabinósido
16	57.85	283	705	-	513	N.I.
17	59.61	529	477	479	317	Petunidina-3-galactósido Petunidina-3-glucósido
17	59.78	346	477	-	300, 315	Isoramnetina-3-galactósido Isoramnetina-3-glucósido
17	59.79	283	705	-	513	N.I.
18	65.27	523	417	419	287	Cianidina-3-arabinósido

19	69.96	524	461	463	301	Peonidina-3-galactósido Peonidina-3-glucósido
19	69.96	524	447	449	317	Petunidina-3-arabinósido
20	72.60	529	491	493	331	Malvidina-3-galactósido Malvidina-3-glucósido
21	77.22	356	609	-	301	Quercetina-3-rutinósido
22	78.13	356	463	-	301	Quercetina-3-galactósido
23	79.60	356	463	-	301	Quercetina-3-glucósido
23	79.77	360	479	-	317; 461	Miricetina-3-galactósido Miricetina-3-glucósido
24	78.63	524	431	433	301	Peonidina-3-arabinósido
24	80.13	529	461	463	331	Malvidina-3-arabinósido
25	80.51	360	461	-	285	Canferol-3-glucurônido
26	82.68	356	433	-	301	Quercetina-3-arabinósido
27	83.63	356	549	-	301	Quercetina(malonil)glucósido
28	84.38	356	433	-	301	Quercetina-3-pentósido
29	84.72	345	593	-	285	Canferol-3-rutinósido
29	85.40	356	433	-	301	Quercetina-3-xilósido
30	86.96	346	623	-	477; 315	Isoramnetina-3-rutinósido
30	87.24	356	447	-	301	Quercetina-3-ramnósido
30	87.24	345	447	-	285	Canferol-3-galactósido Canferol-3-glucósido
30	87.39	360	493	-	331	Laricitrina-3-O-galactósido Laricitrina-3-O-glucósido
30	87.44	360	449	-	317	Miricetina-3-O-pentósido
31	88.77	360	477	-	331	Laricitrina-3-ramnósido
31	88.77	352	505	-	301	Quercetina(acetil)galactósido Quercetina(acetil)glucósido
31	88.77	356	477	-	301	Quercetina-3-glucurônido
31	88.81	358	507	-	345	Siringetina-3-O-galactósido Siringetina-3-O-glucósido
32	97.07	358	491	-	345	Siringetina-3-O-ramnósido
32	97.90	346	491	-	315	Isoramnetina-3-glucurônido*
34	112.50		325	-		N.I.

* Possíveis compostos identificados pela 1ª vez no *V. corymbosum*

Como apresentado na tabela 24, os mirtilos apresentam uma grande diversidade em flavonóis, isto deve-se a pelo menos dois fatores: à variedade de agliconas existentes na natureza (canferol, isoramnetina, miricetina, quercetina, laricitrina, siringetina, etc.), e à variedade de açúcares que se podem ligar às agliconas (galactose, glucose, rutinose, arabinose, ramnose, etc.). Por vezes, para além dos açúcares também se podem ligar às agliconas grupos acetil e malonil, aumentando o número de compostos que se podem formar nas matrizes vegetais. Relativamente aos ácidos fenólicos, os hidroxicinâmicos são os que mais estão presentes no extrato, tal como reportado por Moze et al. (2011) e Rodriguez-Mateus et al. (2012). Apresentam uma enorme diversidade em compostos, encontrando-se também conjugados com açúcares, nomeadamente o ácido cafeico e ferúlico.

Dando especial ênfase às antocianinas, uma vez que são os compostos presentes em maior concentração no mirtilo, na figura 37 são apresentados os cromatogramas no modo *Scan (+)* e DAD a 527nm. No anexo 9 encontram-se os cromatogramas dos iões extraídos das antocianinas identificadas. As antocianinas identificadas foram as delphinidinas-3-O-galactósido e glucósido (pico 14), as cianidinas-3-O-galactósido e glucósido (pico 15), delphinifina-3-O-arabinósido (pico 15), as petunidinas-3-O-galactósido e glucósido (pico 17), a cianidina-3-O-arabinósido (pico 18), as peonidinas-3-O-galactósido e glucósido (pico 19), a petunidina-3-O-arabinósido (pico 19), as malvidinas-3-O-galactósido e glucósido (pico 20), a peonidina-3-O-arabinósido (pico 24) e a malvidina-3-O-arabinósido (pico 24).

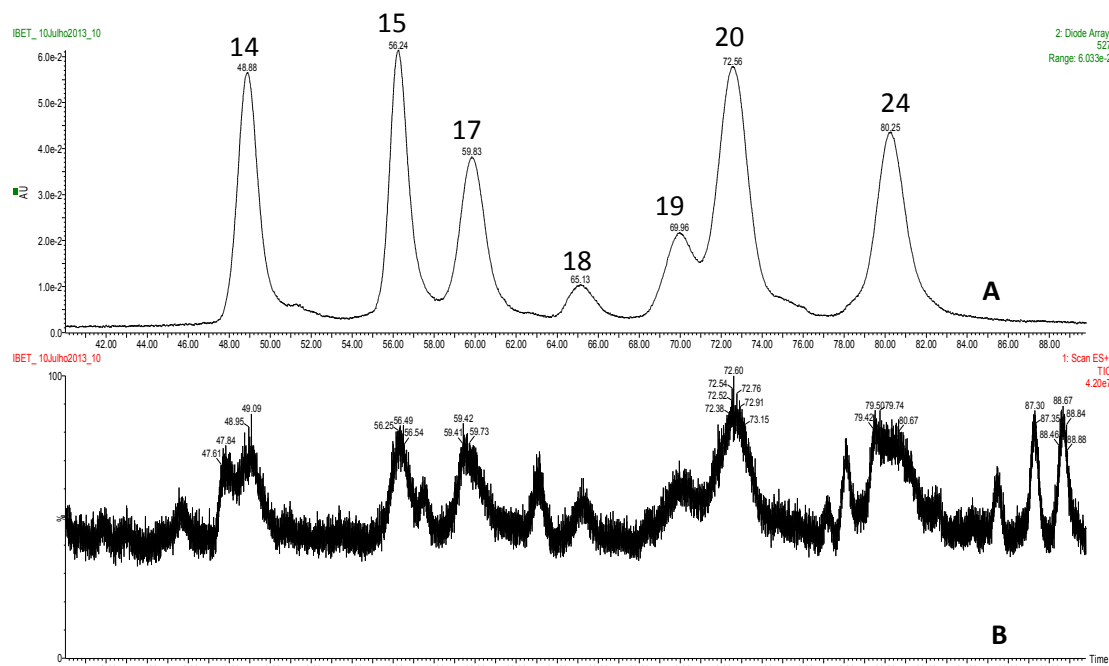


Figura 37 – Cromatograma (LC-DAD-ESI-MS) aos 527nm (A) e o cromatograma obtido em modo *Scan +* (B)

Segundo Merken et al. (2000) nas separações de compostos fenólicos por fase reversa, é de se esperar que a eluição comece pelos compostos mais polares e termine em compostos menos polares. Assim, de um modo geral, os primeiros compostos a eluir são os ácidos fenólicos hidroxibenzóicos, de seguida os hidroxicinâmicos intercalados com a subclasse dos flavanóis, as catequinas e as epicatequinas. De seguida as antocianinas e por fim os compostos das subclasses dos flavonóis, flavonas e flavanonas, tal como se verifica no presente estudo. A polaridade do anel básico das últimas três subclasses é muito similar, mas a adição de grupos hidroxilo à estrutura do anel B resulta numa alteração substancial da polaridade da molécula (Merken et al., 2000).

A partir do HPLC-DAD não foi possível identificar todos os compostos presentes no extrato de mirtilos devido a não existirem todos os padrões disponíveis quer no laboratório quer no mercado. Contudo, a partir do LC-ESI-MS/MS foi possível identificar a grande maioria dos compostos descritos na literatura para a espécie *V. corymbosum* (Borges et al., 2010; Cho et al., 2005; Gavrilova et al., 2011; Moze et al., 2011; Petkovsek et al., 2012; Ranger et al., 2007; Rodriguez-Mateos et al., 2012; Vrhovsek et al., 2012). O facto de não ter sido possível a identificação de todos os compostos reportados deve-se à grande diversidade de cultivares dentro da mesma espécie (fatores genéticos), aos diversos locais e formas de cultivo, maturação, aos fatores climáticos das diferentes regiões, às condições de conservação e armazenamento, e aos diversos métodos de extração e de análise dos extratos.

Foi identificado 1 novo composto, a quercetina-3-xilósido (no pico 29), os cromatogramas do ião extraído e a fragmentação do ião filho encontram-se no anexo 10. É possível que também possam estar presentes outros compostos, nomeadamente a isoramnetina-3-glucurónido (no pico 32) e o resveratrol-3-glucósido (no pico 4). Contudo não foi possível confirmar com 100% certeza, uma vez que os iões moleculares foram muito fragmentados, e o fragmento do ião filho, embora presente, não era o maioritário (anexo 10). Em trabalhos futuros é essencial uma confirmação mais exata. Estes compostos já tinham sido descritos noutras espécies de mirtilos, nomeadamente *V. myrtillus*, mas até à data não encontramos registos para a espécie em estudo neste trabalho (Ayaz et al., 2005; Hokkanen et al., 2009; Koponen et al., 2008; Laaksonen et al., 2010; Latti et al., 2011; Obsón et al., 2011; Primetta et al., 2013; You et al., 2011).

3.2. Quantificação dos compostos fenólicos no extrato de mirtilo

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada através do método do padrão externo. Foram construídas retas de calibração para cada padrão, a diferentes concentrações (anexo 11). Para quantificar os compostos que não tinham padrões disponíveis no laboratório, utilizou-se uma reta de um composto da mesma família e os resultados foram expressos em mg de equivalentes do padrão por 100 gramas de fruto. De seguida, calculou-se o fator de correção do peso molecular (massa do analito/massa do padrão), de acordo com o já descrito por Chandra et al. (2001), cálculos apresentados no anexo 11. A partir da concentração de cada composto obtido anteriormente e do FCPM respetivo foi possível expressar a concentração em mg de composto por 100 gramas de fruta fresca (tabela 25), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Teores } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = (A \times FD) \times \frac{\text{FCPM}}{P_0 \text{ Amostra}}$$

Em que:

A – mg eq. padrão/grama de fruto (anexo 11);

FD - fator de diluição (1:10);

FCPM - fator de correção do peso molecular (anexo 11);

P₀ Amostra - peso inicial da amostra (10 gramas).

Nos picos 3, 9, 23, 29, 30 e 31 estão a eluir ao mesmo tempo compostos com peso molecular diferente, portanto, para a quantificação a partir da fórmula mencionada em cima, foi utilizado apenas um dos FCPM calculados (anexo 11) para cada pico. Os resultados são expressos em mg de equivalentes do respetivo composto (anexo 11). No pico 3 utilizou-se o FCPM do ácido cítrico, no pico 9 utilizou-se o FCPM da catequina, no pico 23 utilizou-se o FCPM da miricetina-3-O-glucósido, no pico 29 utilizou-se o FCPM da quercetina-3-O-xilósido, no pico 30 utilizou-se o FCPM do canferol-3-O-glucósido, no pico 31 utilizou-se o FCPM da quercetina-3-O-glucurónido. No pico 17 o FCPM é igual para os dois compostos que eluem nesse pico, uma vez que têm a mesma massa molecular, logo os resultados podem ser expressos quer em mg de equivalentes dum ou de outro composto. Todos os outros compostos são expressos em mg por 100 gramas de fruta (tabela 25).

Tabela 25 – Concentração dos compostos identificados e alguns dos teores descritos na literatura.

Pico	Nome composto	Concentração (mg/ml extrato)	Concentração (mg/100g fruto)	Teores descritos (mg/100g f)
1	Ácido quínico	0,011 (mg/ml extrato)	1,1 (mg/100g fruto)	3,5 ⁽⁷⁾
2	Ácido málico	0,004 (mg/ml extrato)	0,4 (mg/100g fruto)	1,37 ⁽⁷⁾
3	Ácido cítrico Ácido Chiquímico	0,006 (mg eq ác. Cítrico/ml extr.)	0,6 (mg eq ác. Cítrico/100g)	2,9 ⁽⁷⁾ 0,014 ⁽⁷⁾
7	Ácido cafeico-4-glucósido	0,047 (mg/ml extrato)	4,7 (mg/100g fruto)	0,3±0,2 ⁽⁶⁾
8	Procianidinas Dímeros B	<1ppm (mg/ml extrato)	<1ppm (mg/100g fruto)	1,51±0,15 ⁽⁵⁾
9	Ácido ferulico-4-glucósido Catequina	0,161 (mg eq catequina/ml extr.)	16,1 (mg eq catequina/100g)	1,6±0,38 ⁽⁵⁾ 1,8±0,1 ⁽²⁾
10	Ácido cafeico-3-glucósido	0,046 (mg/ml extrato)	4,6 (mg/100g fruto)	0,21±0,02 ⁽⁵⁾
11	Ácido clorogénico	1,019 (mg/ml extrato)	101,9 (mg/100g fruto)	79±3,4 ⁽⁴⁾
12	Ácido cafeico	0,017 (mg/ml extrato)	1,7 (mg/100g fruto)	0,2±0,0 ⁽²⁾
13	Ácido ferulico-3-glucósido	0,004 (mg/ml extrato)	0,42 (mg/100g fruto)	0,8±0,3 ⁽⁶⁾
17	Isoramnetina-3-galactósido Isoramnetina-3-glucósido	0,029 (mg/ml extrato)	2,91 (mg/100g fruto)	0,19±0,14 ⁽¹⁾ 0,05±0,04 ⁽¹⁾
21	Quercetina-3-rutinósido	0,008 (mg/ml extrato)	0,86 (mg/100g fruto)	2,3±1,9 ⁽¹⁾

22	Quercetina-3-galactósido	0,028 (mg/ml extrato)	2,88 (mg/100g fruto)	6,4±5,2 ⁽¹⁾
23	Quercetina-3-glucósido Miricetina-3-galactósido Miricetina-3-glucósido	0,046 (mg eq miricetina-3-glu/ml extr.)	4,63 (mg eq miricetina-3-glu/100g)	0,11±0,18 ⁽¹⁾ 1,9±0,95 ⁽¹⁾ 0,28±0,15 ⁽¹⁾
29	Canferol-3-rutinósido Quercetina-3-xilósido	0,009 (mg eq quercetina-3-xil/ml extr.)	0,91 (mg eq quercetina-3-xil/100g)	0,18±0,13 ⁽¹⁾ -
30	Isoramnetina-3-rutinósido Quercetina-3-ramnósido Canferol-3-galactósido Canferol-3-glucósido Laricitrina-3-O-galactósido Laricitrina-3-O-glucósido Miricetina-3-O-pentósido	0,065 (mg eq canferol-3-glu/ml extr.)	6,598 (mg eq canferol-3-glu/100g)	0,71±0,54 ⁽¹⁾ 4,6±4,1 ⁽³⁾ 0,73±0,05 ⁽¹⁾ 0,5±0,2 ⁽³⁾ 0,88±0,8 ⁽³⁾ 0,69±0,1 ⁽³⁾ 0,59±0,3 ⁽³⁾
31	Laricitrina-3-ramnósido Quercetina(acetil)galactósido Quercetina(acetil)glucósido Quercetina-3-glucuronídeo Siringetina-3-O-galactósido Siringetina-3-O-glucósido	0,036 (mg eq quercetina-3-glucr/ml extr.)	3,66 (mg eq quercetina-3-glucr/100g)	0,69±0,4 ⁽³⁾ 1,65±1,5 ⁽¹⁾ 0,32±0,82 ⁽¹⁾ 0,25±0,41 ⁽¹⁾ 2,1±1,1 ⁽³⁾ 1,76±1,2 ⁽³⁾
32	Siringetina-3-O-ramnósido	0,008 (mg/ml extrato)	0,839 (mg/100g fruto)	0,8±0,5 ⁽³⁾

(1) Petkovsek et al. (2012); (2) Moze et al. (2011); (3) Vrhovsek et al. (2012); (4) Rodriguez-Mateos et al. (2012); (5) Gavrilova et al. (2011); (6) Belitz e Grosch (2009); (7) Kalt e McDonald (1996)

Não foi possível a quantificação de todos os compostos identificados no extrato devido à interferência das antocianinas que eluem ao mesmo tempo de retenção de outros compostos, contribuindo também para a área do pico a 280 e 360 nm. Os flavonóis que sofreram interferência e não puderam ser quantificados foram a quercetina-3-O-arabinósido, a quercetina-malonil-glucósido, a quercetina-pentósido e o canferol-glucuronídeo. A quantificação dos flavonóides nestas condições teria um enorme erro associado, e por isso a proposta será logo que possível proceder-se à quantificação destes compostos utilizando a espectrometria de massa, de modo a completar a caracterização do extrato.

Relativamente aos compostos quantificados, como se pode observar na tabela 25, os teores encontrados no presente estudo apresentam, em alguns casos, alguma variação, mas regra geral, são concordantes com os teores reportados na literatura. Estas variações devem-se à grande diversidade de cultivares dentro da mesma espécie (fatores genéticos), aos diversos locais e formas de cultivo, maturação, aos fatores climáticos das diferentes regiões, às condições de conservação e armazenamento, e aos diversos métodos de extração e de análise dos extratos (Gavrilova et al., 2011; Moze et al., 2011; Petkovsek et al., 2012; Rodriguez-Mateos et al., 2012; Vrhovsek et al., 2012).

O ácido clorogénico é o ácido fenólico mais abundante nas variedades de mirtilo, seguindo-se o ácido cafeico, o que está de acordo com os dados da bibliografia (Moze et al., 2011; Rodriguez-Mateos et al., 2012). Não foi possível determinar os teores individuais de cada flavonol uma vez que alguns deles apresentavam o mesmo tempo de retenção. Contudo, Vrhovsek et al. (2012) relataram teores que variaram de 7,59 a 16,6 mg de quercetina/100 gramas de fruto, 1,48 a 6,4 mg de miricetina/100 gramas de fruto, 1,32 a 3,29 mg de siringetina/100 gramas de fruto, 1,28 a 2,51 mg de laricitrina/100 gramas de fruto, 0,12 a 1,63 mg de isoramnetina/100 gramas de fruto, e 0,1 a 0,89 mg de canferol/100 gramas de fruto. São reportadas, pelo mesmo autor, grandes diferenças nos teores de flavonóides entre diferentes variedades, e na mesma variedade em alturas do ano diferentes. Os açúcares conjugados presentes em maior quantidade são o galactósido (35,75% a 72,12%) e o glucósido (12,11% a 27,07%), tal como reportado na literatura (Cao et al., 2010; Cho et al., 2005; Gavrilova et al., 2011; Vrhovsek et al., 2012).

O flavonol mais abundante é a quercetina na maioria das variedades de mirtilos, seguindo-se a miricetina, siringetina, laricitrina, isoramnetina e o canferol, estes dois últimos representam menos de 5% do total de flavonóides. À exceção da quercetina, os outros flavonóis são mais dependentes

da variedade estudada (Cao et al., 2010; Cho et al., 2005; Gavrilova et al., 2011; Vrhovsek et al., 2012).

Os taninos condensados ou proantocianidinas estão presentes em quantidades muito pequenas no extrato, tal como o reportado por Gavrilova et al. (2011) e Riihinen et al. (2008). Apenas foi possível a identificação e quantificação das procianidinas B2. Normalmente para a caracterização destes compostos é feito um fracionamento do extrato, devido à sua complexidade. Gavrilova et al. (2011) reportou teores entre 1,75 e 4,52 mg de taninos condensados por 100 gramas de fruto, o que corresponde entre 1 a 3% dos compostos fenólicos presentes no mirtilo. Riihinen et al. (2008) observou um teor total para prodelphinidinas de 6 µg por grama de fruto e para procianidinas de 369 µg por grama de fruto, concluindo que no mirtilo o teor de procianidinas é muito superior ao teor de outras proantocianidinas.

Para a quantificação das antocianinas individuais utilizou-se a reta do padrão de peonidina-3-glucósido disponível no laboratório, e determinou-se a concentração para cada antocianina expressa em equivalentes de peonidina-3-glucósido por 100 gramas de fruto. Para cada uma das antocianinas calculou-se o fator de correção do peso molecular (massa do analito/massa do padrão), de acordo com o já descrito por Chandra et al. (2001) (tabela 26).

Tabela 26 - Fator de correção do peso molecular (FCPM) para a quantificação individual das antocianinas

Pico	Antocianina	Massa analito	Massa padrão	FCPM
14	Delfinidina-3-O-galactósido Delfinidina-3-O-glucósido	465	463	1,00
15	Cianidina-3-O-galactósido	449		0,97
15	Cianidina-3-O-glucósido	449		0,97
	Delfinifina-3-O-arabinósido	435		0,94
17	Petunidina-3-O-galactósido	479		1,03
	Petunidina-3-O-glucósido			
18	Cianidia-3-O-arabinósido	419		0,90
19	Peonidina-3-O-galactósido	463		1,00
	Peonidina-3-O-glucósido	449		0,97
	Petunidida-3-O-arabinósido			
20	Malvidina-3-O-galactósido	493		1,06
	Malvidina-3-O-glucósido			
24	Peonidina-3-O-arabinósido	433		0,94
24	Malvidina-3-O-arabinósido	463		1,00

A partir da concentração de cada antocianina expressa em equivalentes de peonidina-3-glucósido e do FCPM respectivo foi possível quantificar individualmente as antocianinas, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Teores } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = (A \times FD) \times \frac{\text{FCPM}}{P_0 \text{ Amostra}}$$

Em que:

A – mg eq. peonidina-3-O-glucósido/grama de fruto (tabela 27);

FD - fator de diluição (1:10);

FCPM - fator de correção do peso molecular (tabela 26);

P0 Amostra - peso inicial da amostra (10 gramas).

Nos picos 15, 19 e 24 estão a eluir ao mesmo tempo compostos com peso molecular diferente, portanto, para a quantificação a partir da fórmula mencionada em cima, foi utilizado apenas um dos FCPM calculados (tabela 26) para cada pico. Os resultados são expressos em mg de equivalentes do respectivo composto (tabela 27). No pico 15 utilizou-se o FCPM da cianidina-3-O-glucósido, no

pico 19 utilizou-se o FCPM da peonidina-3-O-glucósido e no pico 24 utilizou-se o FCPM da malvidina-3-O-arabinósido. Nos picos 14, 17, 18 e 20 o FCPM é igual para os dois compostos que eluem nesse pico, uma vez que têm a mesma massa molecular, logo os resultados podem ser expressos quer em mg de equivalentes dum ou de outro composto (tabela 27).

Tabela 27 – Teores das antocianinas identificadas e alguns dos valores descritos na literatura

Pico	Antocianina	Conc. (mg eq. Peo-Glu/100g)	Conc.	Conc.	Teores descritos (mg/100 gramas)
14	Delfinidina-3-O-galactósido	27,57	0,275	27,57	23,4±1,4*
	Delfinidina-3-O-glucósido		(mg/ml extrato)	(mg/100g)	15,4±1,4*
15	Cianidina-3-O-galactósido	5,14	0,049	4,98	4,2±0,2*
			(mg/ml extrato)	(mg/100g)	
15	Cianidina-3-O-glucósido	23,39	0,226	22,69	2,6±0,3*
	Delfinifina-3-O-arabinósido		(mg cia-glu/ml ext.)	(mg cia-glu/100g)	24,6±1,7*
17	Petunidina-3-O-galactósido	19,86	0,205	20,54	11,7±0,8*
	Petunidina-3-O-glucósido		(mg/ml extrato)	(mg/100g)	12,4±0,8*
18	Cianidia-3-O-arabinósido	7,33	0,066	6,64	3,5±0,3*
			(mg/ml extrato)	(mg/100g)	-
19	Peonidina-3-O-galactósido	14.14	0,141	14.14	1,8±0,1*
	Peonidina-3-O-glucósido				2,1±0,1*
	Petunidida-3-O-arabinósido				9,3±0,6*
					-
20	Malvidina-3-O-galactósido	34,04	0,362	36,24	34,9±3,1*
	Malvidina-3-O-glucósido		(mg/ml extrato)	(mg/100g)	31,2±3,4*
24	Peonidina-3-O-arabinósido	24.65	0,246	24,65	1,0±0,1*
	Malvidina-3-O-arabinósido		(mg mal-ara/ml ext.)	(mg mal-ara/100g)	34,7±3,7*
					-

*Teores descritos por Moze et al. (2011)

Como se pode observar na tabela 27, os teores encontrados no presente estudo são concordantes com os teores reportados, à exceção do teor de malvidina-3-O-galactósido e glucósido que é inferior, em cerca de metade, aos valores reportados por Moze *et al.* (2011). Estas variações devem-se, tal como os flavonóides, à grande diversidade de cultivares dentro da mesma espécie (fatores genéticos), aos diversos locais e formas de cultivo, à maturação, aos fatores climáticos das diferentes regiões, às condições de conservação e armazenamento, e aos diversos métodos de extração e de análise dos extratos. Burdulis et al. (2009), Moze et al. (2011) e Wang et al. (2008) verificaram que nas variedades do *Vaccinium corymbosum* os glicósidos de malvidina e delfinidina estão presentes em maior quantidade, seguindo-se a petunidina e cianidina, enquanto que os glicósidos de peonidina apresentam os teores mais baixos, tal como foi observado no presente estudo.

3.3. Análise dos compostos com possível atividade eletroquímica

A partir do cromatograma obtido com o detetor eletroquímico é possível ter uma ideia dos compostos que podem estar a contribuir para a atividade eletroquímica, logo poderão ser potenciais antioxidantes no extrato. A facilidade que os compostos apresentam em oxidar-se é determinante para a sua eficiência como antioxidantes, daí ser essencial o estudo eletroquímico dos seus potenciais redox (Born et al., 1996). Uma vez que os compostos fenólicos apresentam estas características, a análise dos mesmos a partir da atividade eletroquímica é muito comum (Guo et al., 1997; Peyrat-Maillard et al., 2000).

Na figura 38 são apresentados os cromatogramas obtidos a partir da análise dos 6 extratos preparados inicialmente para a escolha das melhores condições de ensaio. Os resultados vão ao encontro dos obtidos pelas outras técnicas já referidas. Os extratos apresentam um perfil muito identico, contudo os extratos 4 e 6 apresentam maior sinal eletroquímico. Tal poderá ser explicado pelo facto de os compostos estarem em maiores concentrações, como comprovado pelas técnicas espectrofotométricas.

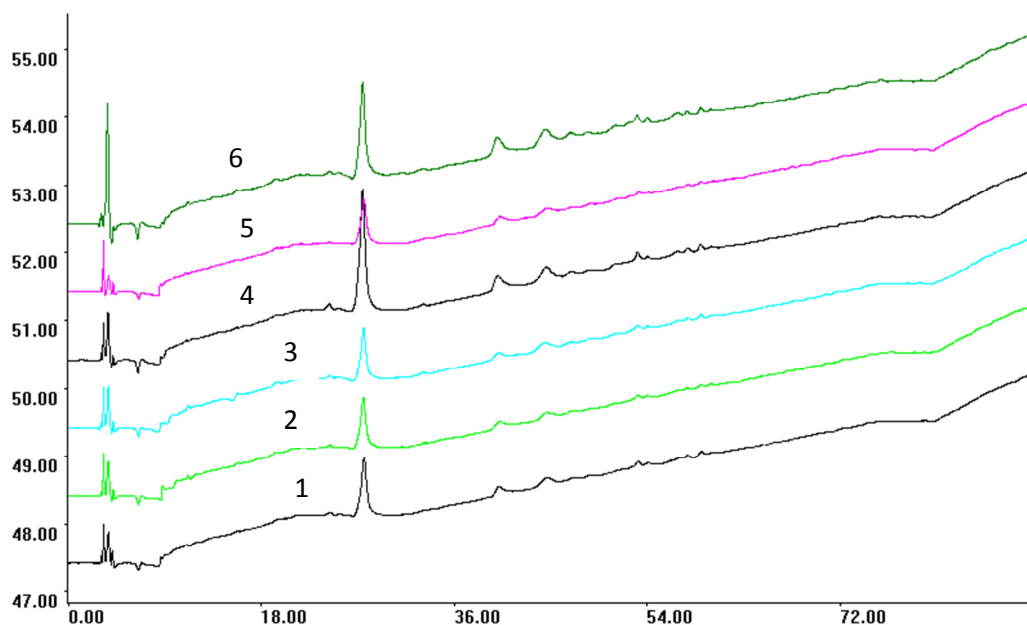


Figura 38 - Cromatograma obtido na análise do extrato 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com o detetor eletroquímico

O extrato administrado aos animais também foi analisado pelo detetor eletroquímico e o cromatograma obtido encontra-se na figura 39. Nem todos os compostos foram identificados por HPLC-DAD ou LC-ESI-MS/MS, contudo também apresentam sinal no cromatograma no DE. A partir da análise dos cromatogramas (HPLC-DAD) a diferentes comprimentos de onda e dos respetivos espectros de absorção foi possível ter a indicação da classe a que eventualmente pertencem. É possível afirmar que no extrato de mirtilo estão presentes várias classes de compostos fenólicos, nomeadamente ácidos hidroxibenzóicos (1), antocianinas (2) e flavonóis (3), eventualmente outros compostos poderão apresentar sinal mas é muito reduzido. Na figura 39 estão identificados os picos através de números que correspondem às diversas classes.

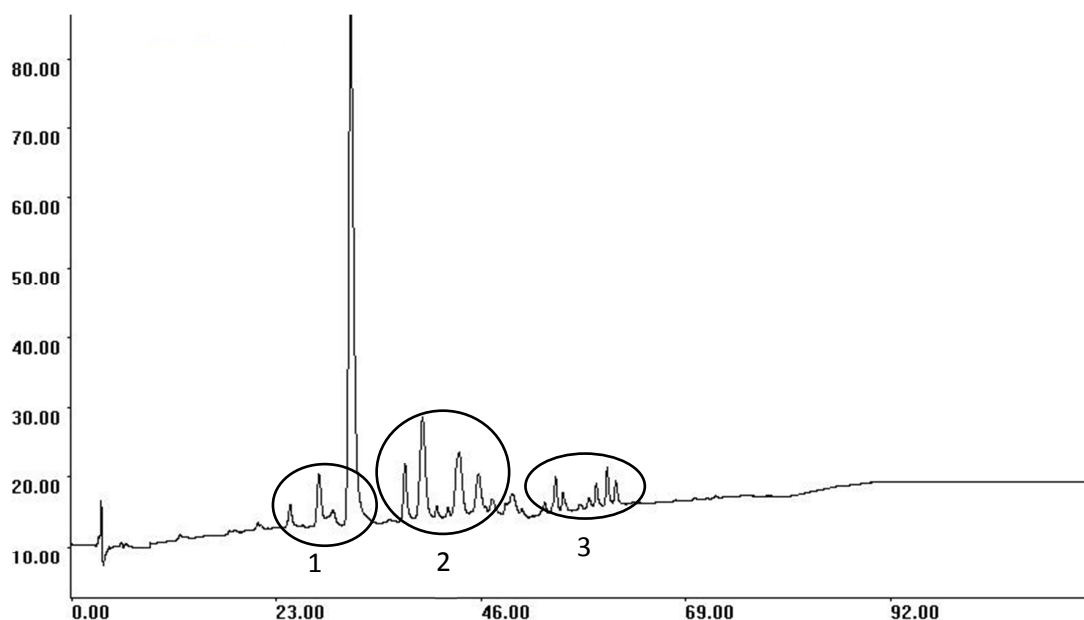


Figura 39 - Cromatograma obtido na análise do extrato administrado aos animais com o detetor eletroquímico (1 - ácidos hidroxicinâmicos; 2 - Antocianinas; 3 - Flavonóis).

O composto que apresenta sinal mais elevado é o ácido clorogénico, tal como seria de se esperar, uma vez que os ácidos hidroxicinâmicos são, maioritariamente, potentes antioxidantes. Esta ação deve-se principalmente à quantidade de grupos hidroxilo presentes na molécula, principalmente os que possuem dois grupos hidroxilo na posição *orto*, como por exemplo o ácido

cafeico e clorogénico (Silva et al., 2000). Os ácidos cafeico-4-glucósido e ferúlico-4-glucósido também apresentam sinal eletroquímico no extrato, contudo é muito inferior ao do ácido clorogénico. Tal poderá ser explicado pelo facto de estes ácidos estarem conjugados com açúcares, diminuindo a sua atividade antioxidante (Silva et al., 2000), contudo a concentração a que estes compostos se encontram também contribui para a intensidade do sinal. A concentração do ácido clorogénico é muito superior à concentração dos ácidos cafeico e ferúlico, explicando também a diferença no sinal eletroquímico.

Outros compostos também apresentam sinal no extrato, principalmente pertencentes às subclasses dos flavonóides. As antocianinas, nomeadamente a delphinidina-3-galactósido e glucósido e cianidina-3-galactósido e glucósido, são as que apresentam maior sinal. Relativamente aos flavonóis, os derivados da quercetina são os que apresentam maior sinal. Tal poderá ser explicado pelo facto de os flavonóides poderem ser eletroquimicamente oxidados e a maioria mostra reações de oxidação. O mecanismo de ação predominante é provavelmente através da doação de um eletrão ao radical livre, tornando-se num radical fenóxido, resultando por sua vez, na formação de uma semiquinona que pode ainda doar mais eletrões até formar a quinona (Pannala et al., 2001). Relativamente à relação entre o potencial de oxidação e o poder antioxidante dos flavonóides, é possível afirmar que quanto mais baixo for o potencial de oxidação, maior é o seu poder antioxidante (Yang et al., 2001). Sabe-se que os flavonóides exibem diferentes potenciais de oxidação e consequentemente diferente poder antioxidante, dependendo da subclasse a que pertencem e dos grupos substituintes que possuem. Os grupos hidróxilo, sobretudo o grupo catecol do anel B, que confere maior estabilidade à forma radical e participa na deslocalização dos eletrões, são os responsáveis pelo carácter antioxidante que estes compostos apresentam (Rice-Evans, 1996). A estrutura do anel C (a dupla ligação no C2-C3 em conjugação com a função cetona no C4, responsável pela deslocalização eletrónica no anel B) e a presença adicional dos grupos hidróxilo nos C3 e C5, são essenciais para o flavonóide exercer o máximo poder antioxidante (Amic et al., 2003; Williams et al., 2004b). Segundo estes critérios, o flavonóide quercetina é o que melhor reúne os requisitos para exercer uma maior ação antioxidante, tal como o observado no presente estudo.

4. Avaliação da capacidade antioxidante

4.1.1. Método ORAC e HORAC

A avaliação da capacidade antioxidante neste estudo é de extrema importância uma vez que está diretamente relacionada com a atividade anti-inflamatória. A atividade antioxidante do fruto reflete a capacidade que alguns compostos têm para neutralizar os radicais livres (Wolfe et al., 2008).

Tabela 28 – Teores de ORAC e HORAC obtidos nos extratos

	ORAC (μmol eq. trolox/L)	HORAC (μmol eq. AC/L)
Extrato 6	59447 ± 6361	18435 ± 1743
Extrato concentrado	50708 ± 6452	14541 ± 1543
Extrato administrado aos animais	22869 ± 1945	5998 ± 110

Os teores mais elevados foram encontrados no extrato 6, para o ensaio ORAC 59447 μmol de equivalentes de trolox/L de extrato, enquanto que para o ensaio HORAC 18435 μmol de equivalentes de ácido cafeico/L de extrato. O extrato administrado aos animais apresentou teores de 22869 μmol de equivalentes de trolox/L de extrato no ensaio ORAC, e 5998 μmol de equivalentes de ácido cafeico/L de extrato no ensaio HORAC. Este extrato apresenta teores muito inferiores comparativamente com os outros dois, uma vez que este extrato é uma diluição (1:2) do extrato concentrado.

A realização dos ensaios ORAC e HORAC demonstrou que o extrato de mirtilo apresenta uma elevada capacidade para a captação de ROS, logo apresenta uma elevada ação antioxidante, mesmo quando comparado com outros frutos (tabela 29). A partir destes resultados é possível afirmar que os compostos fenólicos presentes no extrato desempenham um papel fundamental na atividade antioxidante.

Outros autores também avaliaram a atividade antioxidante pelo método ORAC e HORAC de vários frutos vermelhos (tabela 29). Os valores encontrados na literatura são expressos por 100 gramas de fruto, como tal os resultados acima mencionados foram convertidos e para o ensaio ORAC obteve-se um teor de 5944,7 μmol de equivalentes trolox/100 gramas de fruto, e para o ensaio HORAC obteve-se um teor de 1843,5 μmol de equivalentes ácido cafeico/100 gramas de fruto. Os resultados obtidos são ligeiramente superiores aos descritos na literatura para a espécie em estudo (*V.corymbosum*). O mirtilo apresenta teores de ORAC superiores à maioria dos frutos, contudo a amora é o único fruto onde estes teores são superiores.

Tabela 29 – Teores de ORAC e HORAC para diversos frutos vermelhos

Fruto	ORAC (μmol eq. trolox/100g)	HORAC (μmol eq. AC/100g)	Autores
Mirtilo	5944,7	1843,5	*
	4460 (<i>V. corymb.</i>)		Prior et al. (1998)
	5230 (<i>V. myrt.</i>)		Moyer et al. (2002)
	4826 (<i>V. corymb.</i>)		Wolfe et al. (2008)
	9621 (<i>V. myrt.</i>)		Wolfe et al. (2008)
	4876 (<i>V. corymb.</i>)		You et al. (2011)
	5090 (<i>V. virgatum</i>)		You et al. (2011)
Framboesa	1277	529	Cassius (2011)
	5292		Wolfe et al. (2008)
Amora	5570		Moyer et al. (2002)
	6221		Wolfe et al. (2008)
	4042	834	Denev et al. (2010)
Groselha	3949	874	Denev et al. (2010)

* teores obtidos neste estudo

Embora a atividade antioxidante do extrato de mirtilo seja elevada, muito se tem discutido sobre os compostos que contribuem maioritariamente para esse efeito. Sabe-se que esta atividade depende do número e posição de grupos hidroxilo em relação ao grupo funcional carboxilo na estrutura destes compostos (Aberoumand e Deokule, 2008). A partir da correlação (anexo 12) entre os teores das técnicas espectrofotométricas com os valores de ORAC e HORAC, no presente estudo, verificou-se que todas as classes de compostos contribuem de forma idêntica para a atividade antioxidante, sendo que esta correlação é ligeiramente superior para os fenóis totais e procianidinas. Os valores obtidos são ligeiramente superiores do que os reportados, e, regra geral, o coeficiente de correlação varia entre os estudos, contudo o resultado é consensual na grande maioria dos autores, como consta na tabela 30. Infelizmente não foi possível encontrar na literatura correlações entre os flavonóides, taninos hidrolisáveis e procianidinas, e os ensaios antioxidantes no mirtilo *V. corymbosum*, tendo em conta a técnica espectrofotométrica utilizada.

Tabela 30 – Correlação entre os teores da espectrofotometria e a atividade antioxidante do extrato

	ORAC	(R^2) descrito p/ ORAC	HORAC
Fenóis totais	0.99	0.81 Moyer et al. (2002) 0.85 Prior et al. (1998)	0.99
Flavonóides totais	0.97	-	0.99
Antocianinas totais	0.89	0.78 Moyer et al. (2002) 0.77 Prior et al. (1998)	0.94
Taninos hidrolisáveis	0.87	-	0.92
Procianidinas	0.99	-	0.99

4.2. Avaliação intracelular (*burst* oxidativo dos neutrófilos)

O ensaio da atividade antioxidante intracelular possui a vantagem, em relação aos outros métodos, de retratar exatamente o que acontece dentro das células. O método ORAC e HORAC apenas medem as reações químicas que não podem ser interpretadas da mesma forma que a atividade *in vivo*, não consideram a complexidade dos sistemas biológicos, nomeadamente a biodisponibilidade, estabilidade, retenção tecidual, ou reatividade dos compostos sob condições fisiológicas (Huang et al., 2005).

Cada concentração testada foi analisada em triplicado, de seguida fez-se a média e comparou-se com um branco (sem adição do extrato de mirtilo), portanto neste a oxidação do luminol foi máxima, sendo a percentagem de inibição nula. Os resultados relativos à inibição da oxidação dos neutrófilos pela ação do extrato de mirtilo encontram-se na figura 40.

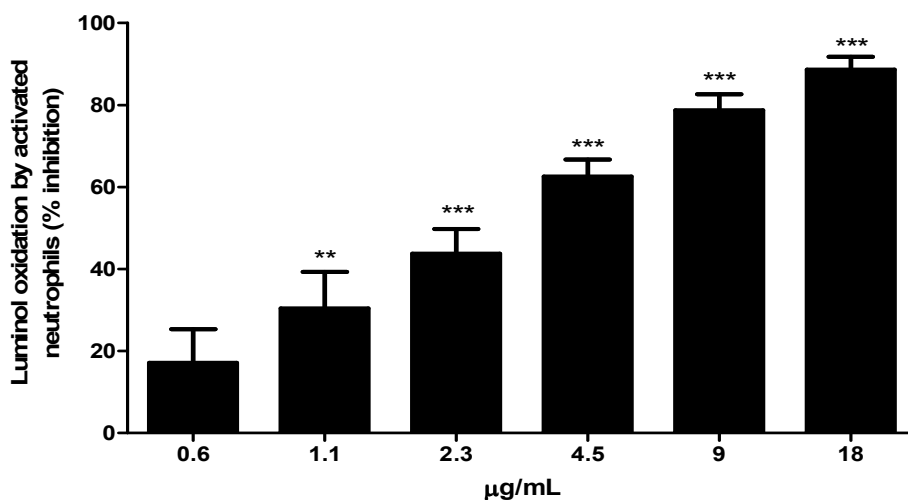


Figura 40 – Inibição da oxidação dos neutrófilos pelo extrato de mirtilo em diferentes concentrações (0.6-18 µg/mL). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

De acordo com a figura 40, verifica-se que a pré-incubação dos neutrófilos com o extrato de mirtilo resultou no aumento da inibição da oxidação do luminol, para concentrações crescentes do extrato. Esta oxidação do luminol resulta da ativação dos neutrófilos com acetato miristato de forbol (PMA). Estatisticamente os resultados obtidos foram todos significativos, com isto podemos afirmar que o extrato de mirtilo é um potente antioxidante mesmo em baixas concentrações (1,1 µg/mL). Na concentração de 18 µg/mL observaram-se os melhores resultados, onde a inibição da oxidação do luminol foi próxima de 90%.

Os resultados mostram que, embora o extrato de mirtilo na concentração de 0,6 µg/mL tenha inibido a oxidação dos neutrófilos, esta inibição não foi estatisticamente significativa. Contudo conseguiu-se uma inibição estatisticamente significativa na concentração seguinte de 1,1 µg/mL, igualmente baixa. É possível afirmar que este efeito depende da dose pois vai aumentando à medida que se aumentou a concentração de compostos fenólicos do extrato.

5. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de mirtilo *in vivo*

5.1. Modelo do edema da pata induzido pela carragenina

Como era esperado houve um aumento significativo do volume da pata nos grupos administrados com carragenina em relação ao grupo controlo, verificando-se uma percentagem de aumento de aproximadamente 70%. Os resultados obtidos demonstram que a administração intraplantar de carragenina produz um aumento do volume da pata que pode ser relacionado com o

desenvolvimento do edema. Assim, pode concluir-se que a carragenina induziu a inflamação pretendida e que este é um modelo para avaliar compostos anti-inflamatórios.

A percentagem de aumento de volume da pata foi aferida com medição do volume da pata esquerda, ou medição do volume de ambas e cálculo de uma média, quando a diferença entre as patas era elevada. Os resultados da medição do volume são apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (figura 41). São também apresentados os resultados de fármacos anti-inflamatórios comerciais, preparados no mesmo laboratório e utilizando o mesmo modelo, para efeitos de comparação dos resultados.

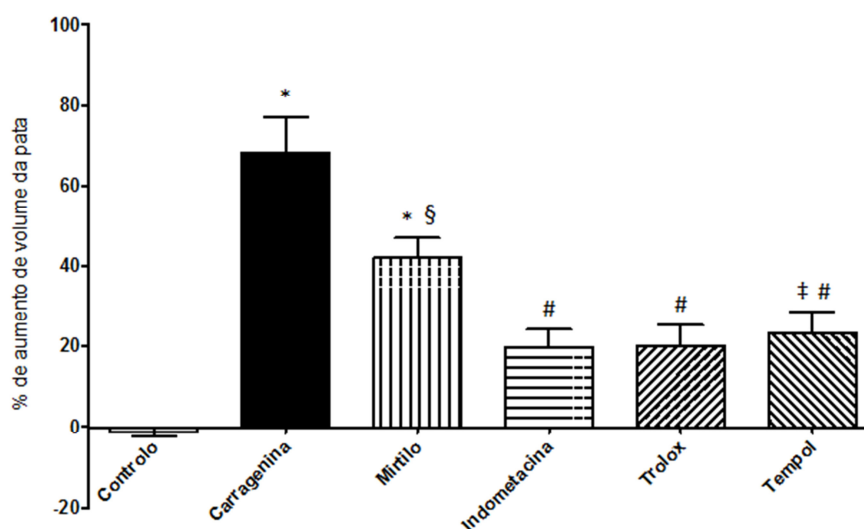


Figura 41- Efeito da administração oral do extrato de mirtilo e de outros fármacos comerciais no aumento do volume da pata 6 horas após a administração da carragenina (* $p < 0,001$ vs. Controlo; ‡ $p < 0,005$ vs. Controlo; # $p < 0,001$ vs. Carragenina; § $p < 0,005$ vs. Carragenina).

A percentagem de aumento do volume da pata no grupo carragenina foi de 70% quando comparado com o grupo controlo, enquanto que no grupo mirtilo foi só de 40%. Há uma diferença significativa quando este último grupo é comparado com o da carragenina. Sabe-se que a resposta inflamatória compreende diversas fases mediadas por diferentes mecanismos. O edema da pata induzido pela carragenina é mediado na fase inicial (1 a 2 horas) pela histamina, hidroxitriptamina e bradicinina, enquanto que na fase tardia (entre 2 a 6 horas) é principalmente mediado por prostaglandinas, cuja produção ocorre após a migração de células polimorfonucleares (Di Rosa et al., 1971). Os resultados obtidos sugerem que o extrato de mirtilo teve efeito anti-inflamatório que, poderá ser justificado pelas suas propriedades antioxidantes e/ou outros tipos de mecanismos. Desta forma, podemos estimar que a capacidade antioxidante dos fenólicos no mirtilo terá levado a uma diminuição da resposta inflamatória, que por sua vez resultou numa redução do edema da pata.

Comparando o efeito anti-inflamatório obtido no extrato de mirtilo com o de fármacos anti-inflamatórios no mesmo modelo, verificámos que a redução do aumento do volume da pata é ligeiramente inferior ao destes. O tempol na dose de 30 mg/kg (um mimético da SOD de baixo peso molecular) diminui o edema em aproximadamente 23%, o trolox na mesma dose (análogo hidrossolúvel da vitamina E) diminui o edema em aproximadamente 20%, e a indometacina na dose de 10 mg/kg (um anti-inflamatório não-esteróide não seletivo para as cicloxigenases), diminui o edema em aproximadamente 20%. Estes resultados demonstram que o extrato de mirtilo apresentou um efeito anti-inflamatório significativo, mesmo sendo inferior ao efeito evidenciado pelos fármacos. Wang et al. (1999 e 2000) analisaram a ação da cianidina isolada e observaram que esta apresenta atividade anti-inflamatória comparável a diversos agentes anti-inflamatórios não esteróides como o naproxeno, ibuprofeno e aspirina. Rotelli et al. (2003) avaliou a ação da quercetina e da rutina no mesmo modelo de inflamação e observaram que a quercetina apresenta

atividade anti-inflamatória superior tanto à da rutina como à fenilbutazona (fármaco anti-inflamatório).

Não é possível afirmar com certeza qual o mecanismo responsável por este efeito, uma vez que o processo inflamatório envolve várias fases. Contudo, fortes evidências indicam-nos que pelo menos um dos mecanismos esteja relacionado com a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes no extrato, uma vez que estes têm a capacidade de neutralizar os radicais livres e as ROS. Como se sabe, estas moléculas desempenham um papel primordial no desenvolvimento da inflamação, nomeadamente em situações de *stress* oxidativo o anião superóxido, o radical hidroxilo, o peróxido de hidrogénio e o peroxinitrito contribuem para a lesão tecidual (Tawaha et al., 2007).

5.2. Modelo de Artrite Reumatóide induzida por Colagénio tipo-II

Durante o ensaio foram observados sinais em especial no grupo controlo positivo, indicadores da inflamação como rubor e o aumento significativo dos volumes das patas devido à formação de edema que levou alguns dos animais a perder movimentos nas patas posteriores. Assim, pode concluir-se que o colagénio tipo II carragenina induziu a inflamação pretendida e que este é um modelo para avaliar compostos anti-inflamatórios. No final do ensaio os ratos administrados com o extrato de mirtilo apresentavam as patas com aspeto semelhante às do grupo controlo negativo, sem evidência de edema. A avaliação da ação anti-inflamatória do extrato de mirtilo foi realizada através da análise do edema da pata e das radiografias das patas dos animais.

5.2.1. Edema da pata

A determinação quantitativa do edema recorre à utilização do pletismómetro e ao modelo de teste anteriormente descrito para a inflamação aguda. O grupo não tratado (AR) representa o grupo de controlo positivo e como já se esperava foi o que apresentou um aumento significativo no volume da pata, aproximadamente 90%, diretamente proporcional à gravidade da lesão desse grupo. No grupo tratado com extrato de Mirtilo observou-se uma redução significativa do volume da pata, cerca de 70% comparativamente ao controlo (figura 42).

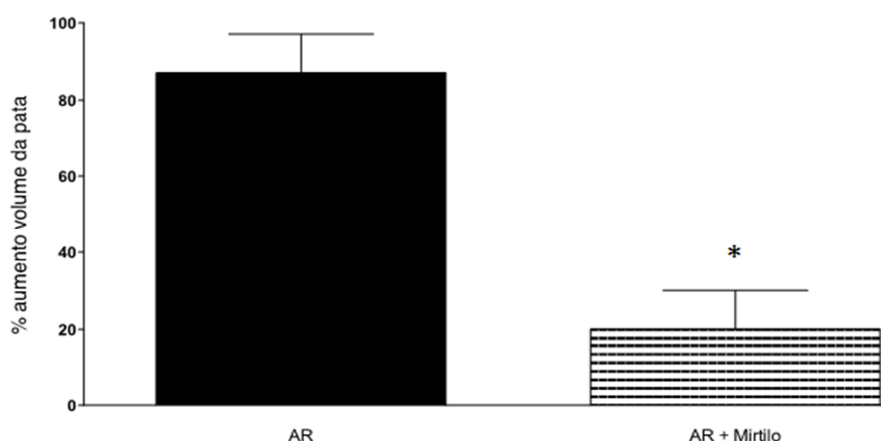


Figura 42- Percentagem de aumento do volume da pata em relação aos animais do grupo controlo. *P <0,001 vs. AR (AR corresponde ao grupo colagénio tipo-II)

Os resultados observados mostram o efeito anti-inflamatório do extrato de mirtilo desta vez num modelo de inflamação crónica. Poderá ser a capacidade antioxidante e/ou eventualmente outro mecanismo de ação dos compostos fenólicos presentes no mirtilo, responsável pela diminuição da resposta inflamatória, que por sua vez resultou numa redução do edema da pata. Subarnas e Wagner (2000) observaram que um extrato rico em antocianinas apresentou atividade anti-inflamatória relacionada com a inibição da cicloxigenase e do TNF- α . O TNF- α é considerado uma citocina inflamatória primária, devido ao seu papel iniciador da cascata de ativação de outras citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8), sendo que o ponto final da cascata resulta na ativação da

cicloxygenase-2 (COX-2) (Sommer e Kress, 2004). Outros polifenóis, presentes no extrato, tais como o ácido clorogénico e a quercetina, inibem a atividade das enzimas cicloxygenase e lipoxigenase, ambas estão relacionadas com a libertação do ácido araquidónico, iniciador da resposta inflamatória (Middleton et al., 2000; Nijveldt et al., 2001).

Comparando estes resultados com os obtidos no modelo de inflamação aguda verifica-se uma diminuição superior no edema das patas dos animais. Possivelmente tal acontece porque neste ensaio existem administrações do extrato durante mais tempo (diariamente, durante 13 dias), ou seja, o tratamento é crónico. Neste tipo de tratamento os níveis plasmáticos de compostos fenólicos são superiores e mantem-se assim, podendo justificar uma ação mais potente e consequentemente uma maior diminuição da atividade inflamatória. É também de referir que estamos na presença de modelos distintos, no primeiro há uma inflamação aguda e o efeito do extrato é também agudo. No modelo AR há uma inflamação crónica e o tratamento com o extrato também é crónico.

5.2.2. Análise radiográfica

As radiografias foram realizadas à pata esquerda posterior dos animais, escolhendo-se para cada grupo uma imagem que representasse uma média do edema observado. Foram radiografadas as patas dos ratos do grupo controlo negativo (figura A), do grupo controlo positivo (figura B) e do grupo mirtilo (figura C/D). O grupo do controlo negativo não apresentou qualquer anormalidade, visto que não lhe foi induzido AR. Contrariamente, o grupo de controlo positivo apresentou edema, lesão articular e óssea, estreitamento da cavidade intra-articular e osteoporose justa-articular. As referidas alterações foram marcadamente diminuídas com a administração do extrato de mirtilo.

Como se pode observar na figura 43 C e D, tanto as articulações como o osso não apresentam erosão nem lesões significativas. Na radiografia consegue visualizar-se ainda um pequeno edema mas de dimensões não comparáveis ao observado no controlo positivo. Pode verificar-se também que em algumas patas, dos animais a que foi administrado o extrato de mirtilo, há diminuição da erosão das áreas subcondrais e da osteosclerose. Assim, os resultados sugerem que o extrato de mirtilo teve um efeito protetor das articulações e também evitou o desenvolvimento do edema neste modelo estudado. Podemos também pensar que a dor inerente a estas manifestações da AR deverá estar diminuída, embora não tenhamos essa medição.

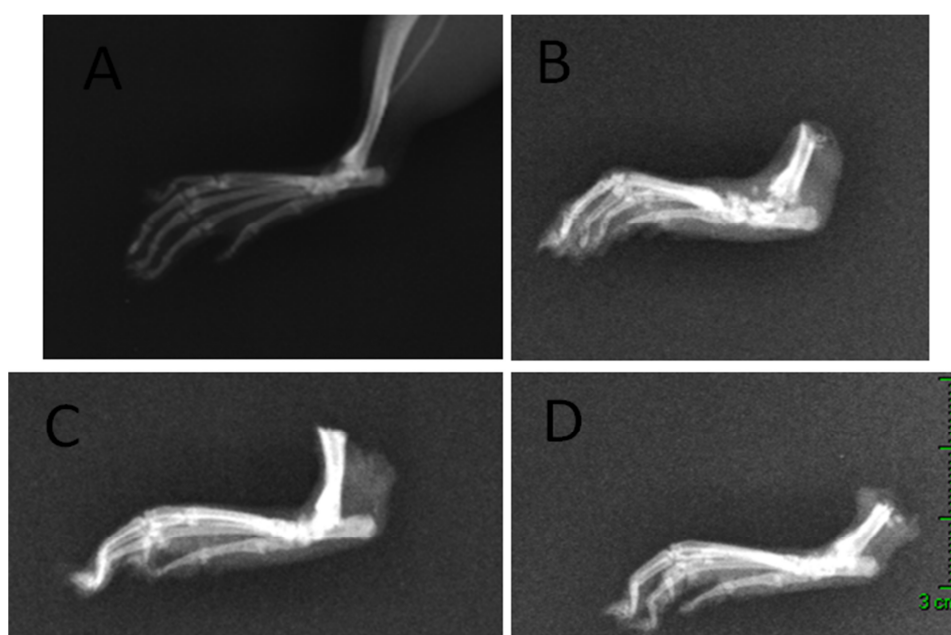


Figura 43 – Radiografias da pata posterior esquerda do grupo controlo negativo (A), do grupo controlo positivo (B), do rato 1 do grupo mirtilo (C), e do rato 3 do grupo mirtilo (D)

O extrato usado nos modelos animais é rico em compostos fenólicos que são compostos com potentes atividades antioxidantes e, como no nosso estudo essas propriedades foram quantificadas tanto *in vitro* como *in vivo*, podemos pensar que o efeito anti-inflamatório demonstrado poderá estar relacionado com um mecanismo antioxidante, mas também poderá dever-se ao poder antioxidante conjuntamente com outros mecanismos. Vários estudos comprovam que a diminuição da patogênese na AR está relacionada sobretudo com a inibição das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , NO, supressão da expressão de COX-2, do Fator de transcrição (NF- κ B), e com o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (Chen et al., 2010; Liu et al., 2009; Nair et al., 2010 e 2012; Pang, et al., 2009; Sun et al., 2011). Uma vez que estas citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes no desenvolvimento da AR, a modulação da sua síntese poderá ser eficaz no tratamento de doenças autoimunes, contudo mais estudos deverão ser feitos para identificar mais e novos mecanismos envolvidos.

Também deverão ser levados a cabo estudos relativos à dose. Como foi referido anteriormente os compostos antioxidantes podem tornar-se pró-oxidantes, e dependendo da dose, podem manifestar efeitos tóxicos (Perron et al., 2005). Assim, e tendo em linha de conta a possível utilização deste extrato ou compostos que dele fazem parte, na prevenção do desenvolvimento de processos inflamatórios crónicos, é importante determinar quais os efeitos benéficos específicos, quais os níveis máximos e mínimos de ingestão com garantia de eficácia e ausência de riscos de toxicidade, e avaliação da ocorrência de efeitos colaterais a longo prazo.

Os resultados obtidos são um bom indicador de que poderá, eventualmente, haver a possibilidade de utilizar este tipo de extratos como adjuvantes da terapêutica com anti-inflamatórios que, como se sabe, têm alguns efeitos secundários. Também se podem encarar os resultados deste estudo como sugestão de que uma suplementação de mirtilos na dieta poderá prevenir estados inflamatórios, especialmente, crónicos e, assim, funcionar como profilaxia de algumas doenças.

A escolha deste modelo recaiu sobre o facto de ser bastante reprodutível, capaz de gerar anticorpos, terminar com a tolerância do próprio sistema imunitário e apresentar vantajosas semelhanças à AR humana. A avaliação anti-inflamatória em modelos animais dá-nos a ideia de como estes compostos se comportam dentro dos sistemas biológicos de acordo com a sua biodisponibilidade.

Conclusões

A partir dos ensaios espectrofotométricos (teores totais de fenóis, antocianinas, flavonóides, taninos hidrolisáveis e procianidinas) concluiu-se que a melhor extração de compostos fenólicos nas amostras de mirtilo foi obtida através do tratamento com azoto líquido, seguindo-se a trituração até obtenção de um pó e a sua dissolução com a solução extratante de etanol:água (60:40 v/v).

A caracterização química do extrato por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS permitiu concluir que os mirtilos apresentam uma grande variedade de compostos fenólicos. Também foi possível concluir que a quercetina é o flavonol mais comum nos mirtilos.

Foi confirmada a identificação de um novo composto para a espécie *V. corymbosum*, a quercetina-3-xilósido. É muito provável estarem presentes mais compostos como o resveratrol-3-glucósido e a isoramnetina-3-glucuronídeo, contudo é essencial uma melhor confirmação.

O teor do extrato em compostos fenólicos é elevado e semelhante ao descrito na literatura, como sendo grande parte do extrato é constituído por antocianinas.

Os resultados dos ensaios de ORAC, HORAC e atividade antioxidante intracelular, mostram que o extrato apresenta elevada ação antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. Este efeito poderá ser um dos mecanismos principais responsável pela atividade biológica dos compostos presentes no mirtilo.

No ensaio de inflamação aguda foi possível concluir que uma única dose do extrato foi capaz de reduzir a inflamação comparativamente com o grupo controlo +, verificando-se uma diminuição significativa do volume da pata. Contudo este efeito não foi tão significativo quando comparado com o de alguns fármacos anti-inflamatórios, demonstrando serem mais eficazes na redução da inflamação, tal como seria de se esperar.

No ensaio de inflamação crónica (AR) verificou-se que a administração oral do extrato de mirtilo diariamente é eficaz na diminuição do edema da pata provocado pela inflamação, já que deu resultados estatisticamente diferentes quando comparados com o controlo positivo. Esta diminuição é visível, sendo possível concluir que o extrato apresenta atividade significativa.

Também se verificou uma redução da lesão articular, da erosão das áreas subcondrais e da osteosclerose. Os resultados obtidos sugerem que o mirtilo apresenta um potente efeito anti-inflamatório.

Assim, os resultados deste estudo sugerem que o extrato de mirtilo é rico em compostos fenólicos, e que estes têm uma ação protetora tanto das articulações como do osso num modelo de inflamação crónica como o da artrite reumatóide, e também diminuem o edema associado à inflamação.

Em conclusão, podemos pensar que o extrato de mirtilo pode ter um papel fundamental na prevenção do desenvolvimento da artrite, bem como ter uma função adjuvante na terapêutica deste tipo de doença inflamatória crónica. Os nossos resultados indicam que as doses requeridas podem ser facilmente transponíveis para o Homem e correspondem a ingestões diárias razoáveis do próprio fruto.

Referências bibliográficas

- Abalea, V., Cillard, J., Dubos, M., Sergent, O., Cillard, P., Morel, I. (1999). Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Rad. Biol. Med.*, 26, 1457–1466.
- Abe, L., Da Mota, R., Lajolo, F., Genovese, M. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ciênc. e Tecn. de Alimentos*, Campinas, 27, 2, 394-400.
- Aberoumand, A., Deokule, S. S. (2008). Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7, 4, 582-585.
- Aguiar, C., Baptista, A., Alencar, S., Haddad, R., Eberlin, M. (2007). Analysis de isoflavonoids from Leguminous plant extracts by RPHPLC/DAD and electrospray ionization mass spectrometry. *Int J Food Sci Nutr.*, 58, 116-24.
- Aguiló, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J., Córdova, A., Pons, A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior*, 84, 1-7.
- Agullo, G., Gamet-Payraastre, L., Manenti, S., Viala, C., Rémés, Y., Chap, H., Payraastre, B. (1997). Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem. Pharmac.*, 53, 1649–1657.
- Aho, K., Heliovaara, M. (1993). Alcohol, androgens and arthritis. *Annual Rheum. Dis.*, 52, 12, 897.
- Alamanos, Y., Drosos, A. (2005). Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 4, 130-136.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T. (2010). Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Arthritis and Rheumatism*, 9, 62, 2569-2581.
- Al-Gubory, K. H., Fowler, P. A., Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, 10, 1634-1650.
- Altindag, O., Karakoc, M., Kocyigit, A., Celik, H., Soran, N. (2007). Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*, 40, 167-171.
- Alvarez-Jubete, H. W., Arendt, E. K., Gallagher, E. (2010). Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119, 770-778.
- Amic, D., Dadidovic-Amic, D., Beslo, D., Trinajstic, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatia Chemica Acta*, 76, 55-61.
- Ângelo, P., Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66, 1, 232-240.
- Anjo, D. L. C. (2004). Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, 3, 145-154.
- Anthony, J., Fyfe, L., Stewart, D., McDougall, G., Smith, H. (2007). The effect of blueberry extracts on *Giardia duodenalis* viability and spontaneous excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *in vitro*. *Methods*, 42, 339–348.
- Antunes, L., Raseira, M., Pereira, J. (2007). Situação atual da oferta e demanda de mirtilo no Brasil. In: Curso produção de mirtilo de baixo requerimento de frio. *Palestras. Pelotas: Embrapa Clima Temperado*.

- Apak, R., Güglü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496–1547.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-99.
- Arora, R., Gupta, D., Chawla, R., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Prasad, J., Singh, S., Samanta, N., Sharma, R. (2005). Radioprotection by plant products: Present status and future prospects. *Phytotherapy Research*, 19, 1-22.
- Asquith, D. L., Miller, A., Iain, B., McInnes, I., Liew, F. (2009). Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 39, 1991–2058.
- Ayaz, F., Kadioglu, A., Bertoft, E., Acar, C., Turna, I. (2001). Effect of fruit maturation on sugar and organic acid composition in two blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* and *V. myrtillus*) native to Turkey. *Journal of Crop and Horticultural Science*, 29, 137-141.
- Ayaz, F., Ayaz, S., Gruz, J., Novak, O., Strnad, M. (2005). Separation, Characterization, and Quantitation of Phenolic Acids in a Little-Known Blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Fruit by HPLC-MS. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53, 8116-8122.
- Baecklund, E., Iliadou, A., Askling, J., Ekblom, A., Backlin, C. Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 2006, 3, 54, 692-701.
- Bagchi, D., Sen, C., Ray, S., Das, D. (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat. Res.*, 523–524, 87–97.
- Bagchi, D., Sen, C., Bagchi, M., Atalay, M. (2004). Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry*, 69, 75–80.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99, 191–203.
- Banados, M. P. (2006). Blueberry production in South America. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 715, 165-172.
- Banal F., Dougados M., Combescure C., Gossec L. (2009). Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.*, 68, 1184–91.
- Bassa, I., Francis, F. J. (1987). Stability of anthocyanins from sweet potatoes in a model beverage. *Journal of Food Science*, 52, 1753-1754.
- Barnes, S., D'alessandro, T., Kirk, M., Patel, R., Boersma, B., Darley-USmar, V. (2004). The importance of *in vivo* metabolism polyphenols and their biological actions. In: *Phytochemicals mechanisms of action*. CRC Press. Boca Raton, 51–60.
- Barnes, J., Nguyen, H., Shen, S., Schug, K. (2009). General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1216, 4728-4735.
- Barreira, J., Ferreira, I., Oliveira, M., Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, 107, 1106-1113.
- Barreiros, A., David, J., David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29, 1, 113-123.
- Bate-Smith, E. C., Swain (1962). Flavonoid Compounds in Comparative biochemistry. M. a. M. Florkin. New-York, *Academic Press*, 3, 755-809.

- Bate-Smith, E. C. (1977). Astringent Tannins of Acer Species. *Phytochemistry* 16, 1421-1426.
- Belitz, H. D., Grosch, W. (2009). *Food Chemistry*, 4. ed. Springer, 2009.
- Bendele, A. M. (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 1, 4, 377-385.
- Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., Beliveau, R. (2007). Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF induced activation of NFkappaB by edible berry juice. *Anticancer Research*, 27, 937- 948.
- Bomser, J., Madhavi, D., Singletary, K., Smith, M. (1996). *In vitro* anticancer activity of fruit extracts from Vaccinium species. *Planta Med.*, 62, 212–216.
- Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., Crozier, A. (2010). Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 3901–3909.
- Born, M., Carrupt, P., Zini, R., Brée, F., Tillement, J., Hostettmann, K., Testa, B. (1996). Electrochemical behaviour and antioxidant activity of some natural polyphenols. *Helvetica Chimica Acta*, 79, 1147-1158.
- Bornsek, S., Ziberna, L., Polak, T., Vanzo, A., Ulrih, N. (2012). Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry*, 134, 1878–1884.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15, 4, 186-190.
- Burdulis, D., Ivanauskas, L., Dirsė, V., Kazlauskas, S., Ražukas, A. (2007). Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *Medicina (Kaunas)*, 43, 12, 971–977.
- Burdulis, D., Arkinas, A., Jasutien, I., Stackevien, E., Nikolajevs, L., Janulis, V. (2009). Comparative study oh anthocyanin composition, antimicrobial, e antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) e blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Drug Research*, 66, 4, 399-408.
- Bravetti, G., Fraboni, E., Maccolini, E. (1989). Preventive medical treatment of senile cataract with vitamin E and *Vaccinum myrtillus* anthocyanosides: Clinical evaluation. *Annali di Ottalmologia e Clinica Oculistica*, 115, 109 –116.
- Breinholt, V., Offord, E., Brouwe, C., Nielsen, S., Brosen, K., Friedberg, T. (2002). *In vitro* investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 609-616.
- Bremer, V., Crisosto, G., Molinar, R., Jimenez, M., Dollahite, S., Crisosto, H. (2008). San Joaquin Valley blueberries evaluated for quality attributes. *California Agriculture*, 62, 3, 91–96.
- Brenna, O., Pagliarini, E. (2001). Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49, 4841-4844.
- Brennan, P., Bankhead, C., Silman, A., Symmons, D. (1997). Oral Contraceptives and Rheumatoid Arthritis: results from a primary care-based incident case-control study. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 6, 126, 817-823.
- Bridle, P., Timberlake, C. (1997). Anthocyanins as natural food colours selected aspects. *Food Chemistry*, 58, 103-109.
- Brouillard, R., Chassaing, S., Isorez, G., Kueny-Stotz, M., Figueiredo, P. (2010). The Visible Flavonoids or Anthocyanins. In: Research to Applications, in *Recent Advances in Polyphenol Research*, Volume 2, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 352.

- Cacace, J., Mazza, G. (2006). Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *Journal of food science*, 68, 1.
- Cai, Y., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 2872-2888.
- Calixto, J. B. (2000). Kinins in pains and inflammations. *Pain*, 87, 1-5.
- Calixto, J. B., Otuki, M. F., Santos, A. (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Planta Med.* 69: 973-983.
- Çam, M., Hisil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123, 878–885.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. (1997). Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 5, 749–760.
- Cao, J., Chen, W., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhao, X. (2010). Content of selected flavonoids in 100 edible vegetables and fruits. *Food Science and Technology Research*, 16, 395–402.
- Cardoso, R. M., Barrère, A. P., Noronha, F., Trovão, C. (2009). Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde. *Educ. Contin. Saúde*, 7, 2, 106-9.
- Carlsen, H., Myhrstad, M., Thoresen, M., Moskaug, J., Blomhoff, R. (2003). Berry intake increases the activity of the glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice. *The Journal of nutrition*, 133, 2137–2140.
- Carmona, L., Hernandez-Garcia, C., Vadillo, C., Pato, E., Balsa, A., Gonzalez-Alvaro, I. (2003). Increased risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 30, 7, 1436–9.
- Casadesus, G., Shukitt-Hale, B., Stellwagen, H., Zhu, X. (2004). Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats. *Nutr. Neurosci.*, 7, 309–316.
- Cassidy, A., Brown, J., Hawdon, A., Faughnan, M., King, L., Millward, J., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B., Setchell, K. (2006). Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *The Journal of nutrition*, 136, 1, 45-51.
- Cassidy, A., Hanley, B. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal Science Food Agriculture*, 80, 7, 1044-1062.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M., Rodríguez, J., Galán-Vidal, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Castrejón, A., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L., Huyskenskeil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109, 564- 572.
- Cebeci, F., Sahin-Yesilcubuk, N. (2013). The matrix effect of blueberry, oat meal and milk on polyphenols, antioxidant activity and potential bioavailability. *Int. Journal Food Science Nutr.*, Early Online: 1–10.
- Cerqueira, M., Souza-Neta, L., Passos, M., Lima, E., Roque, N., Martins, D., Guedes, M., Cruz, F. (2007). Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 998-1003.
- Cevallos-Casals, B., Cisneros-Zevallos, L. (2003). Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from andean purple corn and red-fleshed sweet potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3313-3319.

- Chan, S., Lee, C., Yap, C., Wan Aida, W., Ho, C. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16, 203-213.
- Chandra, A., Rana, J., Li, Y. (2001). Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and HPLC-MS. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49, 3515-3521.
- Chang, Q., Zuo, Z., Chow, M., Ho, W. (2005). Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59, 549-555.
- Chatterjee, A., Yasmin, T., Bagchi, D., Stohs, S. (2004). Inhibition of *Helicobacter pylori* in vitro by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. *Mol. Cell. Biochem.*, 265, 19–26.
- Chen, G., Yin, Z., Zheng, X. (2010). Effect and mechanism of total flavonoids of orange peel on rat adjuvant arthritis. *China journal of Chinese materia medica*, 35, 10, 1298.
- Chen, Y., Yang, L., Lee, T. (2000). Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kB activation. *Biochem. Pharmacol.*, 59: 1445–1457.
- Chitarra, M., Chitarra, A. (2005). Pós-colheita de frutas e hortaliças: *fisiologia e manuseio*. 2. ed. Lavras: UFLA. 783.
- Cho, M., Howard, L., Prior, R., Clark, J. (2005). Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2149–2158.
- Choy, E., Panayi, G. S. (2001). Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 344, 907-916.
- Cignarella, A., Nastasi, M., Cavalli, E., Puglisi, L. (1996). Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: A comparison with ciprofibrate. *Thromb. Res.*, 84, 311–322.
- Cisse, M., Vaillant, F., Acosta, O., Mayer, C., Dornier, M. (2009). Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6285-6291.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins: Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1063–1072.
- Cohen, S., Dore, R., Lane, N. (2008). Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum.*, 58, 1299–309.
- Cooper-Driver, G. A. (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, 56, 229-236.
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., Williamson, G. (2008). Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*, 99, 1-11.
- Connor, A. M., Luby, J. J., Hancock, J. R., Berkheimer, S., Hanson, E. J. (2002). Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 893-898.
- Cos, P., De Bruyne, N., Hermans, N., Apers, S., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A. (2003). Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. *Current medicinal chemistry*, 10, 345-1359.

- Coutinho, M., Muzitano, M., Costa, S. (2009). Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. *Revista Virtual Química*, 1, 3, 241-256.
- Covic, T., Pallant, J., Tennant, A., Cox, S., Emery, P., Conaghan, P. (2009). Variability in depression prevalence in early rheumatoid arthritis: a comparison of the CES-D and HAD-D Scales. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 10, 18.
- Covington, A. D. (2006). The chemistry of tanning materials. In: *Conservation of leather and related materials*, ed. M. Kite e R. Thomson, Elsevier Butterworth-Heinemann, Oxford, 22-35.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C. (2002). Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 618-621.
- Cuendet, M., Oteham, C., Moon, R., Pezzuto, J. (2006). Quinone Reductase Induction as a Biomarker for Cancer Chemoprevention. *Journal of Natural Products*, 69, 460–463.
- Cushnie, T., Lamb, A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- Cuzzocrea, S., McDonald, M., Mota-Filipe, H., Mazzon, E., Constantino, G., Britti, D., Mazzullo, G., Caputi, A., Thiemermann, C. (2000). Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 43, 2, 320-328.
- Day, A., Canada, F., Diaz, C., Kroon, P., Mclauchlan, W., Faulds, C., Plumb, G., Morgan, M., Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.*, 468, 2-3, 166-170.
- Degáspari, C., Waszcynskyj, N. (2004). Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, 5, 1, 33-40.
- Del Bo, C., Riso, P., Campolo, J., Møller, P., Loft, S., Klimis-Zacas, D., Brambilla, A., Rizzolo, A., Porrini, M. (2013). A single portion of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) improves protection against DNA damage but not vascular function in healthy male volunteers. *Nutrition Research*, 33, 220–227.
- Del Rincon, I. D., Williams, K., Stern, M. P., Freeman, G. L., Escalante, A. (2001). High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.*, 44, 2737-45.
- Denev, P., Ciz, M., Ambrozova, G., Lojek, A., Yanakieva I., Kratchanova M. (2010). Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*, 123, 1055-1061.
- Dewick, P. M. (2002). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. *John Wiley & Sons, Ltd.*
- Dicko, M. H., Gruppen, H., Traoré, A. S., Voragen, A., Van Berkel, W. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1, 1, 21-38.
- Di Rosa, M., Giroud, J., Willoughby, D. (1971). Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol.*, 104, 1, 15-29.
- Divi, R. L., Doerge, D. R. (1996). Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 16-23.
- Donovan, J., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A. (2001). Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *Journal Nutr.*, 131, 6, 1753-7.
- Dowd, O., Hershtine, R., Harn, S., Naganathan, S. (1995). Vitamin K and energy transduction: a base strength amplification mechanism. *Science*, 269, 1684–1691.

- Drewnowski, A., Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: A review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1424-1435.
- Dubost, N., Ou, B., Beelman, R. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105, 727-735.
- Duffy, K., Spangler, E., Devan, B., Guo, Z., Bowker, J., Janas, A., Hagepanos, A., Minor, R., Decabo, R., Mouton, P., Shukitt-Hale, B., Joseph, J., Ingram, D. (2008). A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. *Neurobiology of Aging*, 29, 1680-1689.
- Dunlap, W., Llewellyn, L., Doyle, J., Yamamoto, Y. (2003). A microtiter plate assay for screening antioxidant activity in extracts of marine organisms. *Marine Biotechnology*, 5, 3, 294-301.
- Duthie, S. J. (2007). Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: Evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 665-674.
- Eaton, W., Hayward, C., Ram, R. (1992). Schizophrenia and rheumatoid arthritis: a review. *Schizophrenia Research*, 6, 3, 181-92.
- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Keller, A., Ulrich, D., Kroh, L., Rohn, S. (2011). UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 126, 60-64.
- Ek, M., Engblom, D., Saha, S., Blomqvist, A., Jakobsson, P., Ericsson-Dahlstrand, A. (2001). Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature*, 410, 430-31.
- Elisia, I., Hu, C., Popovich, D., Kitts, D. (2007). Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chem.*, 101, 3, 1052-1058.
- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3774-3779.
- Fachinello, J. C. (2008). Mirtilo. *Rev. Bras. Frutic.*, 30, 2.
- FAO. Consultado em Outubro de 2013, de FAOStat: <http://faostat.fao.org>
- Farragher, T., Goodson, N., Naseem, H. (2008). Association of the HLA-DRB1 gene with premature death, particularly from cardiovascular disease, in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum.*, 58, 359-69.
- Faria, A., Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., Freitas, V., Mateus, N. (2005). Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6896-6902.
- Feldmann, M., Brennan, F. M., Maini, R. N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual Review Immunology*, 14, 397-440.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475, 89-111.
- Ferguson, P., Kurowska, E., Freeman, D. J., Chambers, A. F., Koropatnick, D. J. (2004). A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines, *J. Nutr.*, 134, 1529-1535.
- Fernandez, S., Wasowski, C., Loscalzo, L., Granger, R., Johnston, G., Paladini, A., Marder, M. (2006). Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology*, 539, 168-176.
- Ferrari, C., Torres, E. (2002). Novos compostos dietéticos com propriedades anti carcinogénicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48, 3, 375-382.

- Ferreira, D., Rosso, V., Mercadante, A. (2010). Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus spp.*). *Rev. Bras. Frutic.*, 32, 3, 664-674.
- Ferreira, D., Slade, D., Marais, J. (2006). Flavans and Proanthocyanidins. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL., 553 – 616.
- Ferreira, I., Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanalise*, IV(2), 32-39.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.*, 36, 4.
- Fine, A., Matsui, R., Zhan, X., Poliks, C., Smith, B., Goldstein, R. (1992). Discordant regulation of human type-1 collagen genes by prostaglandin E2. *Biochim. Biophys. Acta*, 1135, 67–72.
- Fiorucci, S., Meli, R., Bucci, M., Cirino, G. (2001). Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem. Pharmacol.*, 62, 11, 1433-8.
- Firestern, G. S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423, 356-361.
- Fischer, L. M., Schlienger, R. G., Matter, C., Jick, H., Meier, C. R. (2004). Effect of rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus on the risk of first-time acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology*, 15, 93, 2, 198–200.
- Flis, S., Jastrzebskia, Z., Namiesnikb, J., Arancibia-Avilac, P., Toledoc, F., Leontowiczd, H., Leontowiczd, M., Suhaje, M., Trakhtenbergf, S., Gorinstein, S. (2012). Evaluation of inhibition of cancer cell proliferation in vitro with different berries and correlation with their antioxidant levels by advanced analytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 62, 68–78.
- Fonseca, Oliveira (2007). A planta de mirtilo: Morfologia e fisiologia. *Divulgação AGRO*, 556, 2, 1-27.
- Fossen, T., Carbrita, L., Andersen, M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 63, 4, 435–440.
- Fraga, C. G. (2009). Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology. *New Jersey: Wiley & Sons*, 593.
- Francis, F. J. (2000). Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*, 45, 208-213.
- Freitas, R. M. (2008). Alterações comportamentais e neuroquímicas durante a fase aguda do processo convulsivo induzido por pilocarpina. *Revista Electronica de Farmácia*, 5, 3, 60-70.
- Fushiya, S., Kishi, Y., Hattori, K., Batkhuu, J., Takano, F., Singab, A., Okuyama, T. (1999). Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages in vitro. *Planta Med.*, 65, 404–407.
- Galli, R., Bielinski, D., Azprengiel, A., Shukitt-Hale, B., Joseph, J. (2006). Blueberry supplemented diet reverses age-related decline in hippocampal HSP70 neuroprotection, *Neurobiol. Aging*, 27, 344–350.
- Galvano, F., La Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N., Tavazzi, B., Galvano, G. (2004). Cyanidins: metabolism and biological properties. *J. of Nut. Biochemistry*, 15, 1, 2-11.
- Galvano, F. (2008). Protocatechuic acid: The missing human cyanidins' metabolite. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 386–387.
- Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M., Tulliez, J., Chap, H., Payrastre, B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen. Pharmacol.*, 32, 279–286.
- Gao, X., Xu, Y., Janakiraman, N., Chapman, R., Gautam, S. (2001). Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1299-1308.

Gavrilova, V., Kajdzanoska, M., Gjamovski, V., Stefova, M. (2011). Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 4009-4018.

Gee, J., Dupont, S., Day, A., Plumb, G., Williamson, G., Johnson, I. (2000). Intestinal Transporte of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.*, 130, 2765-2771.

Giada, M., Mancini Filho, J. (2006). The importance of dietary phenolic compounds in the promotion of human health. *Publicação UEPG Ciências Biologia Saúde*, 12, 4, 7-15.

Gibney, M., Macdonald, I., Roche, H. (2006). Nutrição e metabolismo. *Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 2006.

Gilroy, D., Lawrence, T. (2008). The resolution of acute inflammation: A 'tipping point' in the development. In: *The resolution of inflammation*, 1-18.

Giovanelli, G., Buratti, S. (2009). Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, 112, 903-908.

Giusti, M., Wrolstad, R. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217-225.

Giustil, M., Wrolstad, R. (2001). Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: *Current protocols in food analytical chemistry*, New York. Wiley, 1-13.

Gossiau, A., Li, S., Ho, C., Chen, K., Rawson, N. (2011). The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Mol Nutr Food Res*, 55, 1, 74-82.

Gottlieb, M. G. V. (2009). Status antioxidante, diabetes mellitus II e aterosclerose. *Revista Saúde e Pesquisa*, 2, 1, 99-106.

Grayer, R. J., Veitch, N. C. (2005). Flavanones and Dihydroflavanols. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Anderson. CRC Press, Boca Raton, 917-1002.

Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., Prior, R. (2002). Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Foods with an Optimized Normal-Phase HPLC-MS Fluorescent Detection Method. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4852-4860.

Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. (2004). Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *J. Nutr.*, 134, 613-617.

Guardia, T., Rotelli, A., Osvaldo, A. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rats. *Il farmaco*, 56.

Gulati, R., Agarwal, S., Agarwal, S. (1995). Hepatoprotective studies on *Phyllanthus emblica* and quercetin. *Indian Journal of Experimental Biology*, 33, 261-268.

Guo, C., Cao, G., Sofic, E., Prior, R. (1997). High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: relationship to oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1787-1796.

Gupta, O., Sing, S., Bani, S., Sharma, N., Malhotra, S., Gupta, B., Banerjee, S., Handa, S. (2000). Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of silymarin acting through inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine*, 7, 21-24.

Guyton, A., Hall, E. (2006). Textbook of medical physiology. 11th ed. *Philadelphia: Elsevier Saunders*, 429-438.

Jarrett, S., Conaghan, P., Sloan, V. S. (2006). Preliminary evidence for a structural benefit of the new bisphosphonate zoledronic acid in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 54, 1410-14.

Jorge, F., Brito, P., Pepino, L., Portugal, A., Gil, H., Costa, R. P. (2001). Aplicações para as cascas de árvores e para os extratos taninosos. *Silva Lusitana*, 9, 2, 225–236.

Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N. A., Bielinski, D. (1999). Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation, *J. Neurosci.*, 19, 8114–8121.

Joseph, J. A., Shukitt Hale, B., Casadesus, G. (2005). Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 313-316.

Hagerman, A. (2002). *Tannin chemistry*. <http://www.users.muohio.edu/hagermae/> (acesso em 30/08/2013)

Hahn-Obercyger, M., Stark, A., Madar, Z. (2005). Grape fruit and oroblanco enhance hepatic detoxification enzymes in rats: possible role in protection against chemical carcinogenesis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 5, 1828-1832.

Hakkinen, S., Torronen, A. (2000). Content of favonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: infuence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33, 517-524.

Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 5, 715-724.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Lolinger, J., Aruoma, O. (1995). The characterization on antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, 33, 7, 601-617.

Halliwell, B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life Sciences. *Nature publishing group*, 1-7.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 18, 685–716.

Halliwell, B., Gutteridge, J. (2007). Free radicals in biology and medicine. 4^a ed. New York: Oxford University Press.

Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 107-112.

Hancock, J. (2001). Blueberry characteristics range among the varieties. *The Fruit Growers News*, 36–37.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.

Harb, J. Y., Streif, J. (2004). Controlled atmosphere storage of Highbush blueberries cv. 'Duke'. *European Journal of Horticultural Science*, 69, 66-72.

Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

Harris, C., Burt, A., Saleem, A., Le, P., Martineau, L., Haddad, P., Bennett, S., Arnason, J. (2007). Single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochemical Analysis*, 18, 2, 161-169.

Haslam, E. (2007). Vegetable tannins - lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, 68, 2713-2721.

- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105, 1126-1134.
- He, J. (2008). Isolation of anthocyanin mixtures from fruits and vegetables and evaluation of their stability availability and biotransformation in the gastrointestinal tract. *The Ohio State University*.
- He, J., Giusti, M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science Technology*, 1, 163-187.
- Heilmann, J., Merfort, I. (1998a). Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. *Pharmazie in unserer Zeit*, 2, 27, 58-65.
- Heilmann, J., Merfort, I. (1998b). Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharmazie in unserer Zeit*, 4, 27, 173-183.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- Heinonen, I., Meyer, A., Frankel, E. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4107-4112.
- Heliovaara, M., Aho, K., Knekt, P. (2000). Coffee consumption, rheumatoid factor, and the risk of rheumatoid arthritis. *Annual Rheum. Dis.*, 59, 8, 631–635.
- Hipólito-Reis, C. (2008). Vinho, gastronomia e saúde. 1ª ed. Editora da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 460.
- Hochberg, M., Silman, A., Smolen, J., Weinblatt, M., Weisman, M. (2009). Rheumatoid Arthritis. *Mosby Elsevier*.
- Hokkanen, J., Mattila, S., Jaakola, L., Pirttilä, A., Tolonen, A. (2009). Identification of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Hybrid Bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) Leaves. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 57, 9437–9447.
- Holst, B., Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 2, 73-82.
- Hu, C., Kitts, D. (2001). Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems *in vitro*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 218, 147-155.
- Huang, C. A., Zayas, J. F. (1991). Phenolic acid contribution to taste characteristics of corn germ protein flour products. *Journal of Food Science*, 56, 1308-1312.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- Hui, Y., Barta, J., Cano, M., Gusek, T., Sidhu, J., Sinha, N. (2006). Handbook of fruits and fruit processing. *Wiley-Blackwell*, 697.
- Hutabarat, L., Greenfield, H., Mulholland, M. (2000). Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. *J Chromatogr. A*, 886, 55-63.
- Hwang, S., Yoon, W., Lee, O., Cha, S., Kim, J. (2014). Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chemistry*, 146, 71–77.
- Iwashina, T. (2003). Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biological Sciences in Space*. 17, 24-44.

- Jaswal, S., Mehta, H., Sood, A., Kaur, J. (2003). Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clinica Chimica Acta*, 338, 123-129.
- Jiménez, C., Martizéz, E., Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de Faculdade de Medicina – UNAM*, 52, 2, 73-75.
- Jolly, M., Curran, J. (2004). Chlamydial infection preceding the development of rheumatoid arthritis: A brief report. *Clin. Rheumatol.*, 23, 5, 435–453.
- Jonsson, I., Verdrengh, M., Brisslert, M. (2007). Ethanol prevents development of destructive arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104, 258–63.
- Jung, M. J., Heo, S., Wang, M. (2008). Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chemistry*, 108, 482-487.
- Jung, W. Y., Park, S. J., Park, D. H., Kim, J. M., Kim, D. H., Ryu, J. H. (2010). Quercetin impairs learning and memory in normal mice via suppression of hippocampal phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein expression. *Toxicological letters*, 197, 97-105.
- Kader, A. A. (1995). Regulation of fruit physiology by controlled/modified atmospheres. *Acta Horticulturae*, 398, 59-70.
- Kader, A. (1996). Maturity, ripening and quality relationships of fruit-vegetables. *Acta Horticulture*, ISHS, Davis, USA, 434, 249–255.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., Metche, M. (1996). Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.) *Food Chemistry*, 55, 1, 35–40.
- Kahkonen, M., Heinamaki, J., Ollinainen, V., Heinonen, M. (2003). Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1403-1411.
- Kaisu, R., Jaakola, L., Karenlampi, S., Hohtola, A. (2008). Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and northblue blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. Angustifolium*). *Food Chemistry*, 110, 1, 156-160.
- Kallberg, H., Jacobsen, S., Bengtsson, C. (2008). Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies. *Annual Rheum. Dis.*
- Kallberg, H., Padyukov, L., Plenge, R. M. (2007). Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.*, 80, 867–75.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M. N. (1997). Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-catechin in red wine and in model solutions. *Journal of Sensory Studies*, 12, 25-37.
- Kalt, W., Lawand, C., Ryan, D., McDonald, J., Donner, H., Forney, C. (2003). Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(6), 917-923.
- Kalt, W., McDonald, J., Donner, H. (2000). Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity of Processed Lowbush Blueberry Products. *Journal of Food Science*, 65, 3, 390-393.
- Kalt, W., Ryan, D., Duy, J., Prior, R., Ehlenfeldt, M., Vander-Kloet, S. (2001). Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of Highbush and Lowbush Blueberries (*Vaccinium cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4761-4767.
- Kalt, W. (2005). Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70, 1, 11-19.

- Kalt, W., Foote, K., Fillmore, S., Lyon, M., Lunen, T., McRae, K. (2008). Effect of blueberry feeding on plasma lipids in pigs. *British Journal of Nutrition*, 100, 70-78.
- Kang, H., Ecklund, D., Liu, M., Datta, S. K. (2009). Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoids, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive Th1 and Th17 cells. *Arthritis Research and Therapy*, 11, 1-13.
- Kannan, K., Ortmann, R. A., Kimpel, D. (2005). Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*, 12, 167-181.
- Kannan, K., Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7, 153-163.
- Karlson, E. W., Lee I. M., Cook, N. R., Manson, J. E., Buring, J. E., Hennekens, C. H. (1999). A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis Rheum.*, 42, 910-917.
- Karlson, E. W., Mandl, L. A., Hankinson, S. E., Grodstein, F. (2004). Do breastfeeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheum.*, 50, 3458-67.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557.
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. (2002). Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1, 68-75.
- Kay, C., Holub, B. (2002). The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *Br. J. Nutr.*, 88, 389-397.
- Kechinski, C. P., Guimarães, P., Norena, C., Tessaro, I., Marczak, L. (2010). Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *Journal of Food Science*, 75, 2, 173-176.
- Kechinski, C., Schumacher, A., Marczak, L., Tessaro, I., Cardozo, N. (2011). Rheological behavior of blueberry (*Vaccinium ashei*) purees containing xanthan gum and fructose as ingredients. *Food Hydrocolloids*, 25, 299-306.
- Kylli, K., Nohynek, L., Puupponen-Pimia, R., Westerlund-Wikstrom, B., Leppanen, T., Welling, J., Moilanen, E., Heinonen, M. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European Cranberry (*Vaccinium microcarpon*) Proanthocyanidins: Isolation, Identification, and Bioactivities. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3373-3384.
- Khanbabaee, K., van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Products Reports*, 18, 641-649.
- Kim, H. P., Son, K., Chang, H., Kang, S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal Pharmacological Sciences*, 96, 3, 229-45.
- Klareskog, L., Catrina, A. I., Stephen, P. (2009). Rheumatoid arthritis seminar, 373, 659-672.
- Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K. (2006). A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.*, 54, 38-46.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T. and Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560-568.
- Koca, I., Karadeniz, B. (2009). Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 121, 447-450.
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., Brouillard, F. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.

Koponen, J., Happonen, A., Auriola, S., Kontkanen, A., Buchert, J., Poutanen, K., Torronen, A. (2008). Characterization and Fate of Black Currant and Bilberry Flavonols in Enzyme-Aided Processing. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 3136–3144.

Kostyuk, V., Kraemer, T., Sies, H., Schewe, T. (2003). Myeloperoxidase/nitrite mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. *FEBS Lett*, 537, 146-150.

Kostyuk, V. A., Potapovich, A. I., Strigunova, E. N., Kostyuk, T. V., Afanasev, I. B. (2004). Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 428, 204-208.

Kraft, T., Schmidt, B., Yousef, G., Knight, C., Cuendts, M., Kang, Y. H. (2005). Chemopreventive potential of wild, lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis. *Journal of Food Science*, 70, 159-166.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2010). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, submetido.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Garcia-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., Fett, R. (2004). Actividade antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24, 4, 691-693.

Kyo, R., Nakahata, N., Sakakibara, I., Kuba, M., Ohizumi, Y. (1998). Baicalin and baicalein, constituents of an important medicinal plant, inhibit intracellular Ca²⁺-elevation by reducing phospholipase C activity in C6 rat glioma cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, 50, 1179–1182.

Laaksonen, O., Sandell, M., Kallio, H. (2010). Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fractions. *Eur. Food Res. Technol.*, 231, 271–285.

Lacombe, A., Wu, V., White, J., Tadeipalli, S., Andre, E. (2012). The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology*, 30, 124-131.

Lätti, A., Riihinen, K., Jaakola, L. (2011). Phenolic compounds in berries and flowers of a natural hybrid between bilberry and lingonberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe). *Phytochemistry*, 72, 810–815.

Lavadinho, C., Sousa, M., Moldão-Martins, M. (2001). Influência da data de colheita na qualidade do mirtilo. *Atas 5º Encontro de Química de Alimentos: Qualidade, Segurança, Inovação*, 346–348.

Lau, F. C., Shukitt-Hale, B., Joseph, J. A. (2005). The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiology of Aging*, 26, 128-132.

Lefèvre, S., Knedla, A., Tennie, C. (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.*, 15, 1414–20.

Li, B., Fu, T., Gong, W., Dunlop, N., Kung, H., Yan, Y., Kang, J., Wang, J. (2000). The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology*, 49, 295-306.

Li, M., Yudin, A., Vandevoort, C., Sabeur, K., Primakoff, P., Overstreet, J. (1997). Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids. *Biol. Reprod.*, 56, 1383–1389.

Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P., Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112, 454–460.

Liang, Y., Huang, Y., Tsai, S., Lin-Shiau, S., Chen, C., Lin, J. (1999). Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 20, 1945–1952.

- Lim, P., Wuenschell, G., Holland, V., Lee, D., Pfeifer, G., Rodriguez, H., Termini, J. (2004). Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. *Biochemistry*, 43, 15339-15348.
- Lima, V., Guerra, N. (2003). Antocianinas: Atividade Antioxidante e Biodisponibilidade. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 37, 121-128.
- Lin, N., Sato, T., Takayama, Y., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M., Ito, A. (2003). Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 65, 2065-2071.
- Liu, F., Ang, C., Springer, D. (2000). Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using surface methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 3364-3371.
- Liu, Y. (2009). Suppression of complete Freund's adjuvant-induced adjuvant arthritis by cobra toxin. *Acta pharmacologica sinica*, 30, 2, 219-227.
- Lohachoompol, V., Mulholland, M., Szrednicki, G., Craske, J. (2008). Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chemistry*, 111, 1, 249-254.
- MacGregor, A., Snieder, H., Rigby, A. (2000). Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.*, 43, 30-37.
- Machado, H., Nagem, T., Peters, V., Fonseca, C., Oliveira, T. (2008). Flavonoids and potential therapeutic. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, 27, 1/2, 33-39.
- Madhavi, D., Bomser, J., Smith, M., Singletary, K. (1998). Isolation of bioactive constituents from *Vaccinium myrtillus* (bilberry) fruits and cell cultures. *Plant Science*, 131, 95-103.
- Magalhães, L., Segundo, M., Reis, S., Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1, 1-19.
- Maher, P., Akalshi, T., Abe, K. (2006). Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proceedings of National academy of Sciences United States of America*, 103, 16568-16573.
- Malacrida, C. R., Motta, S. (2006). Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade, *B. cepa. Curitiba*, 24, 1, 59-82.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230-242.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition.*, 79, 727-747.
- Mancini-Filho, J. (2006). Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. In: *Alimentos funcionais*. Viçosa: UFV, 202.
- Manhita, A., Teixeira, D., Costa, C. (2006). Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetables samples. *Journal of Chromatography A*, 1129, 14-20.
- Mantle, D., Falkous, G., Perry, E. (1999). Effect of flavonoids on protease activities in human skeletal muscle tissue in vitro. *Clin. Chim. Acta*, 285, 13-20.
- Marchand, L. L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 296-301.
- Markham, K. R., Bloor, S. J. (1998). Analysis and identification of flavonoids in practice, In *Flavonoids in health and disease*. Eds. Marcel Dekker Inc., New York, 1-34.

- Marra, C. (2006). Rheumatoid arthritis: A primer for pharmacists. *American Society of Health-System*, 63.
- Maradit-Kremers, H., Crowson, C., Nicola, P. (2005). Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum.*, 52, 402–11.
- Martin, A. R., Villegas, I., La Casa, C., La Lastra, C. A. (2004). Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochemical Pharmacology*, 67, 1399-1410.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. (2002). Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271–278.
- Martineau, L. C., Couture, A., Spoor, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Harris, C., Meddah, B. (2006). Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine*, 13, 612–623.
- Matsubara, S., Rodriguez-Amaya, D. B. (2006). Conteúdo em miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. *Ciência Tecnológica Alimentos*, 26, 2, 380-385.
- Mattson, C. (2003). Essentials of Patophysiology: Concepts of Altered Health States. *Lippincott Williams & Wilkins*, 73-89.
- Mazza, G., Brouillard, R. (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, 25, 207-225.
- McDougall, G., Kulkarni, N., Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, 115, 193–199.
- McDougall, G., Stewart, D. (2005). The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 23, 4, 189-195.
- McInnes, I., Schett, G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews: Immunology*, 7, 429-42.
- Medina, M. (2011). Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of functional foods*, 3, 79 – 87.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 7203, 428-35.
- Melo, E., Guerra, N. (2002). Ação Antioxidante de Compostos Fenolicos Naturalmente Presentes em Alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 36, 1-11.
- Mendham, J., Denney, R. C., Barnes, J. D., Thomas, M. (2002). Análise Química Quantitativa. *LTC*, 8, 410-411.
- Merken, H., Beecher, G. (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, 897, 177-184.
- Mesa-Vanegas, A., Gaviria, C., Cardona, F., Sáez-Veja, J., Trujillo, S., Rojano, B. (2010). Antioxidant activity and total phenols from some species of *Calophyllum* genus. *Revista Cubana de Plantas Medicinas*, 15, 2, 13-26.
- Meskin, M., Bidlack, W., Davies, A., Lewis, D., Randolph, R. (2004). Phytochemicals mechanisms of action. *CRC Press*. Boca Raton, 21–33.
- Meune, C., Emmanuel, T., Trinquart, L., Allanore, Y. (2010). Trends in cardiovascular mortality in patients with Rheumatoid arthritis over 50 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology*, 48, 1309–13.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol.*, 52, 673-751.

- Migliore, L., Coppedé, F. (2009). Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research*, 674, 73-84.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15, 12, 9252-87.
- Miller, A. L. (1996). Antioxidant flavonoids: Structure, function and Clinical Usage. *Alternative Medicine Review*, 1, 103-111.
- Miniati, E. (2007). Assessment of phenolic compounds in biological samples. *Ann. Ist. Super Sanità*, 43, 362-368.
- Mi Yoo, K., Hwan Lee, C., Lee, H., Moon, B., Yong Lee, C. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106, 929-936.
- Molan, A., Lila, M., Mawson, J. (2008). Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. *Food Chem.*, 107, 1039–1044.
- Molina, J., Calvo, D., Medina, J., Barrau, C., Romero, F. (2008). Fruit quality parameters of some southern highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in Andalusia (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 4, 671–676.
- Moreland, L. W., Genovese, M. C., Sato, R., Singh, A. (2006). Effect of etanercept on fatigue in patients with recent or established rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 55, 287–93.
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*, 58, 8, 1935–1945.
- Morton, L. W., Caccetta, R. A., Puddey, I. B. and Croft, K. D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27, 152-159.
- Morvan, J., Berthelot, J., Devauchelle-Pensec, V. (2009). Changes overtime in the diagnosis of rheumatoid arthritis in a 10 year cohort. *J. Rheumatol.*, 36, 2428–34.
- Moyer, R., Hummer, K., Finn, C., Frei, B., Wrolstad, R. (2002). Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 519-525.
- Moze, S., Polak, T., Gasperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Ulrih, N., Abram, V. (2011). Phenolics in Slovenian Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6998–7004.
- Mullen, W., McGinn, J., Lean, M., MacLean, M. (2002). Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50, 5191–5196.
- Mullen, W., Stewart, A., Lean, M., Gardner, P. (2002a). Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50, 5197–5201.
- Murota, K., Terão, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 417, 1, 12-7.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. of Pharm.I and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.

- Nair, V., Singh, S., Gupta, Y. (2012). Evaluation of disease modifying activity of *Coriandrum sativum* in experimental models. *The Indian Journal of Medical Research*, 135, 2, 240.
- Nair, V., Singh, S., Gupta, Y. (2012). Anti-arthritic and disease modifying activity of *Terminalia chebula* Retz. in experimental models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62, 12, 1801-1806.
- Narayana, K., Reddy, M., Chaluvadi, M., Krishna, D. (2001). Biofavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2-16.
- Neto, C. C. (2007). Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 652-664.
- Neves, M., Matos, C., Moutinho, C., Gomes, L., Teixeira, T. (2009). Actividade antioxidante e avaliação *in vitro* da citotoxicidade de extractos aquosos de folhas de *Mentha x piperita*. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, 6, 344-354.
- Nepote, V., Grosso, N., Guzman, C. (2005). Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal Science Food Agriculture*, 85, 33-38.
- Nguyen, M. (1997). Angiogenic factors as tumor markers. *Invest. New Drugs*, 15, 29–37.
- Nigrovic, P., Lee, D. (2005). Mast cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 7, 1–11.
- Nichenametla, S., Taruscio, T., Barney, D., Exon, J. (2006). A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Crit. Rev. Food Sci.*, 46, 161–183.
- Nijveldt, R., Nood, E., Hoorn, D., van Boelens, P., Norren, K., van Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.
- Nikolin, B., Imamovic, B., Medanhodzic-Vuk, S., Sober, M. (2004). High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 4, 5-9.
- Niwa, T. (1995). Clinical mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 242, 15-71.
- Oancea, S., Stoia, M., Comanc, M. (2012). Effects of extraction conditions on bioactive anthocyanin content of *Vaccinium corymbosum* in the perspective of food applications. *Procedia Engineering*, 42, 489–495.
- Obón, J., Díaz-García, M., Castellar, M. (2011). Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 760–771.
- Oh, H, Kim, D, Cho, J, Kim, Y. (2004). Hepatoprotective and free radical activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 421-424.
- Oliver, J. E., Silman, A. J. (2006). Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scand J. Rheumatol.*, 35, 169–74.
- Ohshima, H., Yoshie, S., Auriol, I., Gilibert (1998). Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion, *Free Rad. Biol. Med.*, 25, 1057–1065.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E., Prior, R., Huang, D. (2002). Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2772-2777.
- Pagot, E., Hoffmann, A. (2003). Produção de pequenas frutas no Brasil. In: *Seminário brasileiro sobre pequenas frutas*. Embrapa Uva e Vinho, 9-17. (Documentos 37).

Pagot, E. (2009). *Mirtilo*. Appefrutas: <http://www.appefrutas.com.br/mirtilo.php>

Pang, J. (2009). The effect of the type II collagen protein from *Zaocys* on cytokines production by synoviocytes in rats with adjuvant arthritis. *Journal of Chinese medicinal materials*, 32, 4, 556.

Pannala, A., Chan, T., O'Brien, J., Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid B-ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 1161-1168.

Pantelidis, G., Vasilakakis, M., Manganaris, G., Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, 777-783.

Park, Y., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G., Packer, L. (2000). Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF- κ B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Letters*. 465, 93-97.

Passamonti, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F. (2002). The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 631-636.

Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544, 210-213.

Passos, C., Cardoso, S., Barros, A., Silva, C., Coimbra, M. (2010). Application of Fourier transform infrared spectroscopy and orthogonal projections to latent structures/partial least squares regression for estimation of procyanidins average degree of polymerisation. *Analytica Chimica Acta*, 661, 143-149.

Paul, W., Hartzfeld, R., Mark, D., Hunter, E., ANN E. (2002). Determination of Hydrolyzable Tannins (Gallotannins and Ellagitannins) after Reaction with Potassium Iodate. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1785-1790.

Payne, T. J. (2005). Formulating with Blueberries for Health. *Cereal Foods World*, 50, 5, 262-264.

Pedersen, C., Kyle, J., Jenkinson, A., Gardner, P. (2000). Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 54, 405-408.

Peoples, M., Karnes, H. (2005). Recent developments in analytical methodology for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and related compounds. *Journal Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 827, 5-15.

Pereira, T., Rettori, D. (2009). Comparação da Capacidade Antioxidante de diferentes marcas de chás verdes. In: *Jornada de iniciação científica e tecnológica uniban*. Sao Paulo: uniban, 1-3.

Perron, N. R., Brumaghim, J. L. (2005). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53, 75-100.

Pertuzatti, P., Jacques, A., Zambiasi, R. (2007). Relação de fitoquímicos na casca e polpa de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). *Anais de congresso: XVI CIC/IX ENPOS*.

Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R. (2012). HPLC-MS identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*, 135, 2138-2146.

Pattison, D., Symmons, D., Lunt, M. (2004). Dietary risk factors for the development of inflammatory polyarthritis: Evidence for a role of high level of red meat consumption. *Arthritis Rheum.*, 50, 12, 3804-3812.

Pettit, A. R., Ji, H., von Stechow, D. (2001). TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am. J. Pathol.*, 159, 1689-99.

- Peyrat-Maillard, M., Bonnely, S., Berset, C. (2000). Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51, 709-716.
- Phapale, R., Misra-Thakur, S. (2010). Antioxidant activity and antimutagenic effect of phenolic compounds in *Feronia limonia* (L) swingle fruit. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, 4, 68-73.
- Pieniz, S., Colpo, E., Ruffo, V., Estefanel, V., Andreazza, R. (2009). *In vitro* assessment of the antioxidant potential of fruits and vegetables. *Ciênc. agrotec.*, 33, 2, 552-559.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. of Nat. Products*, 63, 1035-1042.
- Plant, M., Jones, P., Saklatvala, J., Ollier, W., Dawes, P. (1998). Patterns of radiological progression in early rheumatoid arthritis: results of an 8 year prospective study. *J. Rheumatol.*, 25, 417-26.
- Prasain, J., Barnes, S. (2007). Metabolism and bioavailability of flavonoids in chemoprevention: current analytical strategies and future prospectus. *Mol Pharm.*, 4, 6, 846-64.
- Primetta, A., Jaakola, A., Ayaz, F., Inceer, H., Riihinen, K. (2013). Anthocyanin fingerprinting for authenticity studies of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Food Control* 30, 662-667.
- Prior, R., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mcewen, J., O'Brien, C., Lischener, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686-2693.
- Prior, R., Lazarus, S., Cao, G., Muccitelli, G., Hammerstone, J. (2001). Identification of Procyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (*Vaccinium Spp.*) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1270-1276.
- Prior, R. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 3, 570-8.
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10, 4290-4302.
- Prior, R. (2006). Phytochemicals. In: *Modern nutrition in health and disease*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 582-94.
- Prior, R., Wu, X., Gu, L., Hager, T., Hager, A., Wilkes, S., Howard, L. (2009). Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1406-1418.
- Prior, R., Wilkes, S., Rogers, T., Khanal, R., We, X., Howard, L. (2010). Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3970-3976.
- Proença da Cunha, A., Teixeira F., Pereira da Silva, A., Rodrigues Roque, O. (2007). Plantas na terapêutica farmacológica e ensaios clínicos. Lisboa. *Fundação Calouste Gulbenkian*.
- Provenzi, G., Falcão, L., Fett, R., Luiz, M. (2006). Estabilidade de Antocianinas de Uvas Cabernet Sauvignon com β - e γ -Ciclodextrinas. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9, 3, 165-170.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 494-507.
- Quian, Z., Li, H., Li, P., Ren, M., Tang, D. (2007). Simultaneous qualitation and quantification of thirteen bioactive compounds in flos *Lonicerae* by highperformance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 55, 1073-1076.

Rahman, I., Kode, A., Biswas, S. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.*, 1, 6, 3159-65.

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging*, 2, 2, 219-36.

Ramvalho, V., Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29, 4, 755-760.

Ramirez. (2005). Effect of lyophilized *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharm. Research*, 52, 6, 457-462.

Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 427-442.

Rang, H., Dale, M. (2003). Pharmacology. 6^a ed. Elsevier, ch.13.

Rang, H., Dale, M., Ritter, J., Flower, R. (2007). Rand and Dale's Pharmacology. *Seventh Edition*, Churchill Livingstone.

Raseira, M., Antunes, L. (2004). A cultura do mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). Pelotas: *Embrapa Clima Temperado*, 69.

Raso, G., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., Di Carlo, R. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2-expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.*, 68, 921-931.

Ratnam, D., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D., Kumar, M. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113, 3, 189-207.

Redlich, K., Hayer, S., Ricci, R. (2002). Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *Journal Clin. Invest.*, 110, 1419-27.

Rengel, Y., Ospelt, C., Gay, S. (2007). Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res. Ther.*, 9, 221.

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 7, 933-956.

Rieger, M. (2006). Introduction to fruit crops. Binghamton: Food Products, Haworth Press, Inc. p. 462.

Riemersma, R., Rice-Evans, C., Tyrrell, R., Clifford, M., Lean, M. (2001). Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM* 94, 277-282.

Riihinen, K., Jaakola, L., Karenlampi, S., Hohtola, A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry*, 110, 156-160.

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.

Rodrigues, R., Vázquez Oderiz, M., Simal-Lozano, J., López Hernández, J. (1992). Estudio de la composición química de pequeños frutos, arandano, frambuesa, groselha branca, grosella negra, grosella roja y zarzamora producidos en Galicia. *Industria conserve*, 67, 29-33.

Rodriguez-Mateos, A., Cifuentes-Gomez, T., Tabatabaee, S., Lecras, C., Spencer, J. (2012). Procyanidin, Anthocyanin, and Chlorogenic Acid Contents of Highbush and Lowbush Blueberries. *J. Agric.Food Chem.*, 60, 5772-5778.

- Roman, M., Devereux, R., Schwartz, J. (2005). Arterial stiffness in chronic inflammatory diseases. *Hypertension*, 46, 194–99.
- Ross, J. A., Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.
- Rouanet, J., Décordé, K., Del Rio, D., Auger, C., Borges, G., Cristol, J., Lean, M., Crozier, A. (2010). Berry juices, teas, antioxidants and the prevention of atherosclerosis in hamsters. *Food Chemistry*, 118, 266–271.
- Rowland, L. J., Hammerschlag, F. A. (2005). *Vaccinium* ssp. Blueberry. In *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. Vol. 29. Biotechnology in Agricultural Series, CAB International, Wallingford, UK: 222-246.
- Roy, S., Khanna, S., Alessio, H., Vider, J. (2002). Antiangiogenic property of edible berries, *Free Radical Res.*, 36, 1023–1031.
- Ruel, G., Couillard, C. (2007). Evidences of the cardioprotective potential of fruits: The case of cranberries. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 692–701.
- Ruel, G., Pomerleau, S., Couture, P., Lamarche, B., Couillard, C. (2005). Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption. *Metabol. Clin. Exp.*, 54, 856–861.
- Saftner, R., Polashock, J., Ehlenfeldt, M., Vinyard, B. (2008). Instrumental and sensory quality characteristics of blueberry fruit from twelve cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 19–26.
- Saija, A., Princi, P., D'Amico, N., De Pasquale, R., Costa, G. (1990). Effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins on triiodothyronine transport into brain in the rat. *Pharmacol. Res.*, 22, 59–60.
- Sánchez De Medina, F., Galvez, J., Romero, J., Zarzuelo, A. (1996). Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278, 2, 771-779.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121-137.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 7, 1094-1117.
- Sartor, L., Pezzato, E., Dellaica, I., Caniato, R., Biggin, S., Garbisa, S. (2002). Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem. Pharmacol.* 64, 229-237.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492-501.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 4, 287-306.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr. RockvillePike*, 130, 20735- 20855.
- Schneider, C., Oliveira, A. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Brasileira Méd. Esporte*, 10, 4, 309-313.
- Schett G. (2007). Erosive arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 9, 2.

Scibisz, I., Mitek, M. (2007). The changes of antioxidant properties in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*) during freezing and long term frozen storage. *Technol. Aliment.*, 6, 4, 75-82.

Scientific Opinion of EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), EFSA Journal 2011.

Scott, D., Wolfe, F., Huizinga, T. (2010). Rheumatoid Arthritis. *The Lancet*, 376, 1094-1108.

Seelly, R., Stephens, T., Tate, P. (2008). Anatomy & Physiology.

Seeram, N. P. (2006). Berries. *J. Nutritional Oncology*, 2. ed. London: Academic Press. cap. 37, 615-625.

Seeram, N., Adams, L., Zhang, Y., Sand, D., Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329-9339.

Seeram, N., Momin, R., Nair, M., Bourquin, L. (2001). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, 8, 5, 362-369.

Sellappan, S., Akoh, C., Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chemistry*, 50, 8, 2432-2438.

Serafini, M., Testa, M., Villaño, D., Pecorari, M., van Wieren, K., Azzini, E., Brambilla, A., Maiani, G. (2009). Antioxidant activity of blueberry fruit is impaired by association with milk. *Free Radical Biology & Medicine*, 46, 769-774.

Serra, A., Matias, A., Nunes, A., Leitão, M., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M., Romão, M., Duarte, C. (2008). *In vitro* evaluation of olive- and grapebased natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 311-319.

Serra, A., Matias, A., Frade, R., Duarte, R., Feliciano, R., Bronze, M., Figueira, M., Carvalho, A., Duarte, C. (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 – Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal Of Functional Foods* 2, 46-53.

Shapiro, J., Koepsell, T., Voigt, L. (1996). Diet and rheumatoid arthritis in women: A possible protective effect of fish consumption. *Epidemiology*, 7, 3, 256-263.

Shahidi, F., Naczki, M. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals, CRC Press, Boca Raton, FL, 576.

Silva, E., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55, 381-387.

Silva F., Borges, F., Guimarães, C., Lima, J., Matos, C., Reis, S. (2000). Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2122-2126.

Silva, J., Marroquin, E., Matta, F., Garner, J., Stojanovic, J. (2005). Physicochemical, carbohydrate and sensory characteristics of highbush and rabbiteye blueberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 85, 1815-1821.

Silva, M. R., Silva, M. (1999). Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. *Rev. Nutr. Campinas*, 12, 1, 5-19.

Silva, M., Santos, M., Caroço, G., Rocha, R., Justino, G., Mira, L. (2002). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A reexamination. *Free Radical Research*, 36, 1219-1227.

Silva, S., Antunes, L., Anthonisen, D., Lemões, J., Gonçalves, E. (2008). Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 1, 180-184.

Silveira, N., Vargas, P., Rosa, C. (2007). Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo highbush. *Alimentos e Nutrição*, 18, 4, 365–370.

Sinelli, N., Spinardi, A., Egidio, C., Mignani, I., Casiraghi, E. (2008). Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 31–36.

Singleton, V. L., Kratzer, F. H. (1973). Plant phenolic. In: Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. *Rev. Nutr. Campinas*, 1999, 12, 1, 5-19.

Skupień, K. (2006). Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Folia Horticulturae*, 18, 47–56.

Skrede, G., Wrolstad, R., Durst, R. (2000). Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, 65, 2, 357-364.

Skrede, G., Wrolstad, R. (2002). Flavonoids from berries and grapes. In: *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*, 2, CRC Press., 71-133.

Smith, M., Marley, K., Seigler, D., Singletary, K., Meline, B. (2000). Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of food science – Sensory and Nutritive Qualities of Food*, 65, 2, 352–356.

Smith, T., Yang, C. (1994). Effect of food phytochemical on metabolism and tumorigenesis. Food Phytochemicals For Cancer Prevention I. American Chemical Society: Washington, DC, 48.

Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. de Nut.*, 15, 1, 71-81.

Sociedade Portuguesa de Reumatologia, através do link: <http://www.spreatologia.pt/diseases/disease/artrite-reumatoide>

Sommers, T., Evans, M. (1976). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “Chemical Age”. *Journal Sci. Food Agric.*, 28, 279-287.

Sousa, M., Curado, T., Vasconcelos, F., Trigo, M. (2007). Mirtilo–Qualidade pós-colheita. *Divulgação AGRO*, 556, 8.

Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327, 7, 649-662.

Spagolla, L., Santos, M., Passos, L., Aguiar, C. (2009). Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 30, 2, 187-191.

Spencer, J., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E., Srail, S., Rice-Evans, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS LETT*, 458, 2, 224-230.

Spencer, J., Abd-el-Mohsen, M., Rice-Evans, C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys.*, 423, 1, 148-61.

Sriram, P., Subramanian, S. (2011). Fisetin, a bioflavonoid ameliorates hyperglycaemia in streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 6, 68-74.

Srivastava, A., Akoh, C., Yi, W., Fischer, J., Krewer, G. (2007). Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2705-2713.

Stamatakis, G., Tsantila, N., Samiotaki, M., Panayotou, G., Dimopoulos, A., Halvadakis, C., Demopoulos, C. (2009). Detection and isolation of antiatherogenic and antioxidant substances

present in olive mill wastes by a novel filtration system. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 57, 10554–10564.

Stefova, M., Kulevanova, S. and Stafilov, T. (2001). Assay of flavonols and quantification of quercetin in medicinal plants by HPLC with UV-diode array detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 24, 2283-2292.

Strik, B. (2005). Blueberry: An expanding world berry crop. *Horticultural Sciences Focus*, 45, 7-12.

Stobiecki, M. (2000). Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, 54, 237-256.

Stull, A., Cash, K., Johnson, W., Champagne, C., Cefalu, W. (2010). Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *The Journal of Nutrition*, 140, 1764–1768.

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J., Spranger, I. (1998). Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4267-4274.

Sun, S., Wang, Y., Zhou, Y. (2011). Extract of the dried heart wood of *Caesalpinia sappan* L. attenuates collagen-induced arthritis. *Journal of ethnopharmacology*.

Symmons, D. P. (2002). Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Practise and research clinical rheumatology*, 5, 16, 707-722.

Symmons, D., Bankhead, C., Harrison, B. (1997). Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: Results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum.*, 40, 11, 1955–1961.

Taiz, L., Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. *Porto Alegre: Artmed*, 719.

Takemura, S., Klimiuk, P., Braun, A., Goronzy, J., Weyand, C. (2001). T cell activation in rheumatoidsynovium is B cell dependent. *J. Immunol.*, 167, 4710–4718.

Tapas, A., Sakarkar, D., Kakde, R. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1089-1099.

Tavares, J. (2000). Estabilidade do ácido ascórbico em suco de laranja submetido a diferentes tratamentos. *Magistra, Bahia*, 12, 1/2.

Tawaha, K., Alali, F., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104, 1372-1378.

Touyz, R. M. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. What is the clinical significance? *Hipertension*, 44, 248.

Tsuda, T., Horio, F., Osawa, T. (1999). Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- β -Dglucoside in rats. *FEBS Lett.*, Amsterdam, 449, 2-3, 179-182.

Tsuda, T., Ueno, Y., Yoshikawa, T., Kojo, H., Osawa, T. (2006). Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1184–1197.

Turesson, C., Jacobsson, L., Bergstrom, U. (1999). Extra-articular rheumatoid arthritis: prevalence and mortality. *Rheumatology*, 38, 668-674.

USDA (2011). Database for the flavonoid content of selected foods, Release 3, disponível em http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav_R03.pdf.

USDA (2012). National nutrient database for standard reference, Release 25 disponível em <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR25/reports/sr25fg09.pdf>.

- Valente, L., Paixão, D., Nascimento, A., Santos, P. (2010). Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). *Food Chemistry* 123, 1127–1131.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266, 1-2, 37-56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.
- Van der Linden, M., Van der Woude, D., Ioan-Facsinay, A. (2009). Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 60, 2232–41.
- Van der Helm-van Mil, A., Huizinga, T. (2008). Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. *Arthritis Res. Ther.*, 10, 205.
- Van der Helm-van Mil, A., Verpoort, K., Breedveld, F., Toes, R., Huizinga, T. (2005). Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 7, 949–58.
- Van der Woude, D., Houwing-Duistermaat, J., Toes, R. (2009). Quantitative heritability of anticitrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 60, 916–23.
- Van Dongen, H., Van Aken, J., Lard, L. (2007). Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.*, 56, 1424–32.
- Van Oosterhout, M., Bajema, I., Levarht, E., Toes, R., Huizinga, T., van Laar, J. (2008). Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 58, 53–60.
- Vennat, B., Gross, D., Pourrat, A., Pourrat, H. (1992). Hamamelis virginiana: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharm. Acta Helv.*, 67, 1, 11-14.
- Vizzotto, M., Pereira, M. (2009). Metodologia Científica: Otimização do Processo de Extração de Compostos Fenólicos Antioxidantes de Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). Embrapa: Pelotas, 1-18.
- Volp, A., Renhe, I., Barra, K., Stringueta, P. (2008). Flavonoids anthocyanins: characteristics and properties in nutrition and health. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 23, 2, 141-149.
- Vuong, T., Benhaddou-Andaloussi, A., Brault, A., Harbilas, D., Martineau, L., Vallerand, D., Ramassamy, C., Matar, C., Haddad, P. (2009). Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKAY mice. *International Journal of Obesity*, 1-8.
- Vrhovsek, U., Masuero, D., Palmieri, L., Mattivi, F. (2012). Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars *Journal of Food Composition and Analysis* 25, 9–16.
- Wallberg-Jonsson, S., Johansson, H., Ohman, M., Rantapaa-Dahlqvist, S. (1999). Extent of inflammation predicts cardiovascular disease and overall mortality in seropositive rheumatoid arthritis: a retrospective cohort study from disease onset. *Journal Rheumatol.*, 26, 2562–71.
- Walle, T., Walle, U. (2003). The β -D-glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGL1) – inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins 1/2. *Drug Metab. Dispos.*, 31, 11, 1288–1291.
- Walle, T., Otake, H., Walle, U., Wilson, F. (2000). Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J. Nutr.*, 130, 2658-2661.

- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M., Oatis, J., Walle K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metabolism and disposition*, 32, 1377-1382.
- Wan, C., Yuan, T., Cirello, A., Seeram, N. (2012). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers. *Food Chemistry*, 135, 1929–1937.
- Wang, C., Wang, S., Chen, C. (2008a). Increasing Antioxidant Activity and Reducing Decay of Blueberries by Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3587–3592.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R. (1996). Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701–705.
- Wang, J., Mazza, G. (2002). Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 850-857.
- Wang, M., Li, J., Shao, Y., Huang, T. (2000a). Antioxidative and cytotoxic components of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), in: *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*, AOCS Press, Champaign, 271–277.
- Wang, S., Jiao, H. (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5672- 5676.
- Wang, S., Stretch, A. (2001). Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 969–974.
- Wang, S., Zheng, W. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2, 873-878.
- Wang, S., Rentian, F., Bowman, L., Penhallegon, R., Ding, M., Lu, Y. (2005). Antioxidant activity in lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea* L.) and its inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor- κ B, and mitogenactivated protein kinases activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3156-3166.
- Wang, S., Chen, C., Sciarappa, W., Camp, M. (2008). Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5788–5794.
- Wang, S., Camp, M., Ehlenfeldt, M. (2012). Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium spp.*) cultivars. *Food Chemistry*, 132, 1759–1768.
- Wang, Z., Huang, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y., Wu, J. M. (2002). Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation *in vivo* and *in vitro*. *International Journal of Molecular Medicine*, 9, 77-79.
- Ward, A. (2010). Acute and Chronic Inflammation. In: *Fundamentals of inflammation*, 1-252.
- Wicklund, T., Rosenfeld, H., Martinsen, B., Sundfor, M., Lea, P., Bruun, T., Blomhoff, R., Haffner, H. (2005). Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *Lebensmittel-Wissenschaft und Techn.*, 38, 4, 387-391.
- Williams, C., Grayer, R. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports*. 21, 539-573.
- Williams, R., Spencer, J., Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 838-849.
- Williamson, G. (2004). Common features in the pathways of absorption and metabolism of flavonoids. In: *Phytochemicals mechanisms of action*. CRC Press. Boca Raton, 21–33.
- Williamson, G., Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 243–245.

- Willis, R., Allen, P. (1998). Improved Method for Measuring Hydrolyzable Tannins Using potassium Iodate. *Analyst*, 123, 435-439.
- Wipke, B., Allen, P. (2001). Essential Role of Neutrophils in the Initiation and Progression of a Murine Model of Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology*, 167, 1601-1608.
- Woisky, R., Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.*, 37, 2, 99-105.
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agric. and Food Chem.*, 53, 609-614.
- Wolfe, K., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q., Liu, R. (2008). Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8418-8426.
- Wolfe, F., Caplan, L., Michaud, K. (2006). Treatment for Rheumatoid Arthritis and the Risk of Hospitalization for Pneumonia. *Arthritis & Rheumatism*, 54, 2, 628-634.
- Wrolstad, R., Durst, R., Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 9, 423-428.
- Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the united states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.
- Wu, X., Prior, R. (2005). Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2589-2599.
- Xu, H., Wan, M., Dong, H., But, P., Foo, L. (2000). Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease. *Biological Pharmacological Bulletin*, 23, 1072-1076.
- Yamada, T., Place, N., Kosterina, N., Ostberg, T., Zhang, S., Grundtman, C., Erlandsson-Harris, H., Lundberg, I., Glenmark, Bruton, J., Westerblad, H. (2009). Impaired myofibrillar function in the soleus muscle of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 60, 11, 3280-3289.
- Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., Tokutake, S. (2002). Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR)/f rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4983-4988.
- Yamane, T., Jeong, S., Goto-Yamamoto, N., Koshita, Y., Kobayashi, S. (2006). Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *Am. Journal Enology and Viticulture*, 57, 1, 54-59.
- Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F. (2001). Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Analytical Sciences*, 17, 599-604.
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., Akoh, C. (2005). Phenolic Compounds from Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7320-7329.
- Yi, W., Akoh, C., Fischer, J., Krewer, J. (2006). Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis. *Food Research International*, 39, 628-638.
- Yi, L., Li, C., Zhan, X., Cui, C., Xiao, F., Zhou, L., Xie, Y. (2010). Involvement of monoaminergic system in antidepressant-like effect of flavonoids naringenin in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34, 1223-1228.
- Yoon, J. H., Baek, S. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J.*, 46, 5, 585-96.
- You, Q., Wang, B., Chen, F., Huang, Z., Wang, X., Luo, P. (2011). Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry*, 125, 201-208.

- Youdim, K., Martin, A., Joseph, J. (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 29, 51–60.
- Youdim, K., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W., Joseph, J. (2000a). Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: *In vitro* and *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1523, 117–122.
- Youdim, K., Dobbie, M., Kuhnle, G., Proteggente, A., Abbott, N., Rice Evans, C. (2003) Interaction between flavonoids and the blood–brain barrier: *in vitro* studies. *Journal of Neurochemistry*, 85, 180–192.
- Youdim, K., Shukitt Hale, B., Joseph, J. (2004). Flavonoids And The Brain: Interactions At The Blood–Brain Barrier And Their Physiological Effects On The Central Nervous System. *Free Radical Biology & Medicine*, 37, 1683–1693.
- Yuan, W., Zhou, L., Deng, G., Wang, P., Creech, D., Li, S. (2011). Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity of *Vaccinium L.* in Texas, USA. *Pharmaceutical Crops*, 2, 11-23.
- Zadernowski, R., Naczek, M., Nesterowicz, J. (2005). Phenolic Acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2118-2124.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J., Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 675–683.
- Zhang, L., Zuo, Z., Lin, G. (2007). Intestinal and Hepatic Glucuronidation of Flavonoids. *Molecular Pharmaceutics*, 4, 6, 833-45.
- Zhang, Y., Vareed, S., Nair, M. (2005). Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences*, 76, 13, 1465-1472
- Zhang, Z. (2004). Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4, 688-691.
- Zhao, Y. (2007). Berry fruit: value-added products for health promotion. *CRC Press, EUA*, 4-45.
- Zheng, W., Wang, S. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 502-509.
- Zushang, Su (2012). Anthocyanins and Flavonoids of *Vaccinium L.* *Pharmaceutical Crops*, 3, 7-37.

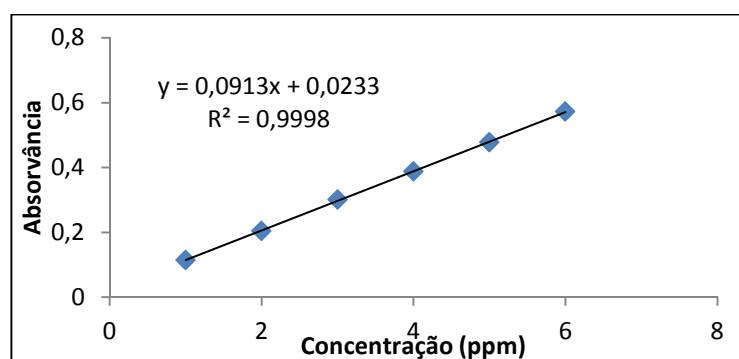
Anexos

Anexo 1 - Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Absorvâncias a 725nm da solução padrão de ácido gálico (concentração de 1 a 6 ppm)

[] ppm	(λ) Abs.
1	0,1145
2	0,2044
3	0,3011
4	0,3879
5	0,4778
6	0,5725

Reta de calibração do ácido gálico para o teor de compostos fenólicos totais.

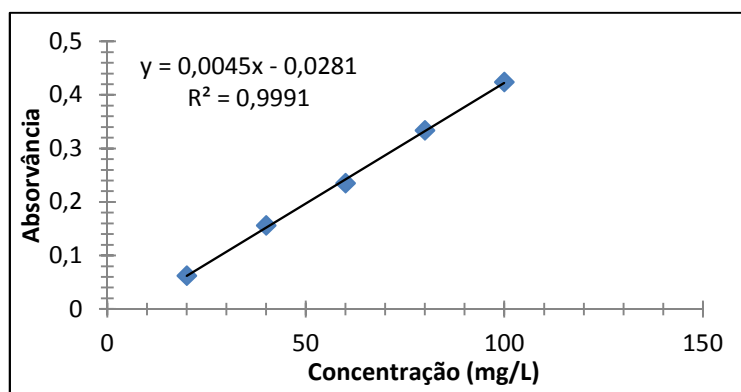


Anexo 2 - Determinação do teor de flavonóides totais

Absorvâncias a 510nm da solução padrão de catequina (concentração 20 a 100 ppm)

[] ppm	(λ) Abs.
20	0,0622
40	0,1561
60	0,2349
80	0,3338
100	0,4238

Reta de calibração da catequina para o teor de flavonóides totais.

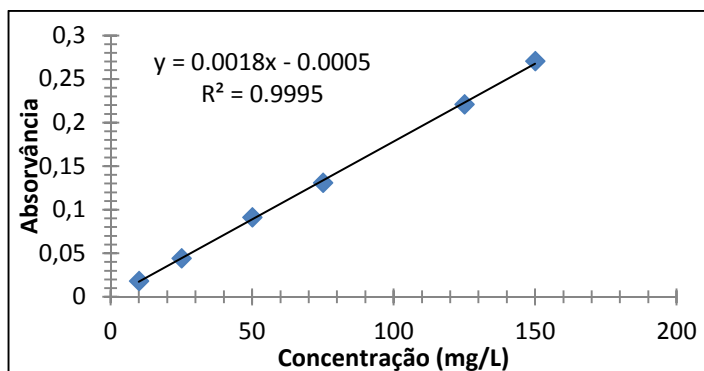


Anexo 3 - Determinação do teor de antocianinas totais

Absorvâncias a 520nm da solução padrão de cianidina-3-glucósido (concentração 10 a 150 ppm)

[] ppm	(λ) Abs.
10	0,018
25	0,044
50	0,091
75	0,1306
125	0,2207
150	0,2703

Reta de calibração da cianidina-3-glucósido para o teor de antocianinas totais

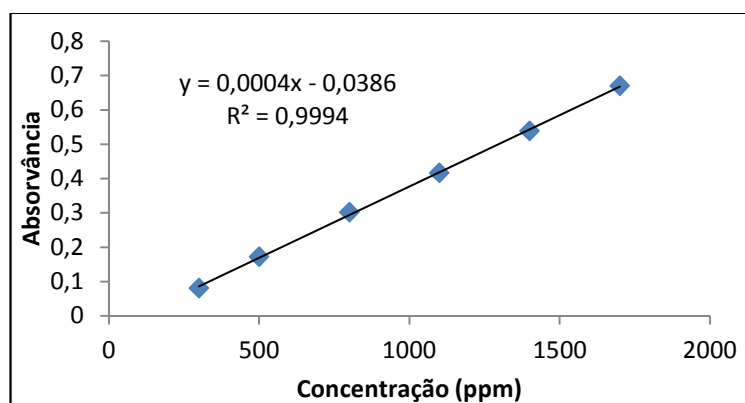


Anexo 4 - Determinação do teor de taninos hidrolisáveis

Absorvâncias a 550nm da solução padrão de ácido tânico (concentração 300 a 1700ppm)

[] ppm	(λ) Abs.
300	0,0808
500	0,1717
800	0,3021
1100	0,4164
1400	0,5381
1700	0,6702

Reta de calibração do ácido tânico para o teor de taninos hidrolisáveis

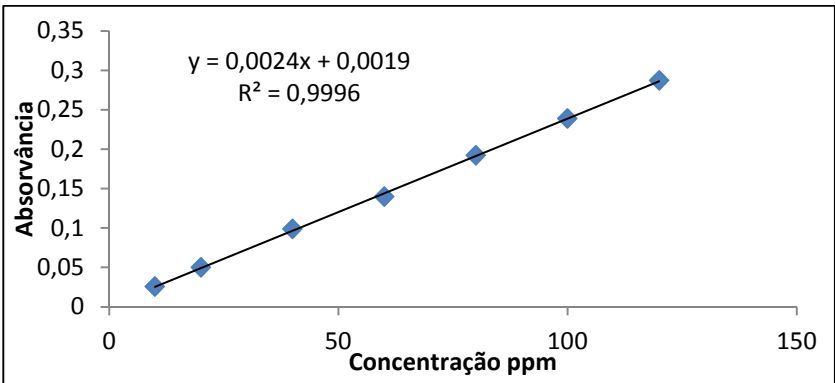


Anexo 5 - Determinação do teor de procianidinas

Absorvâncias a 500nm da solução padrão de catequina (concentração 10 a 120ppm)

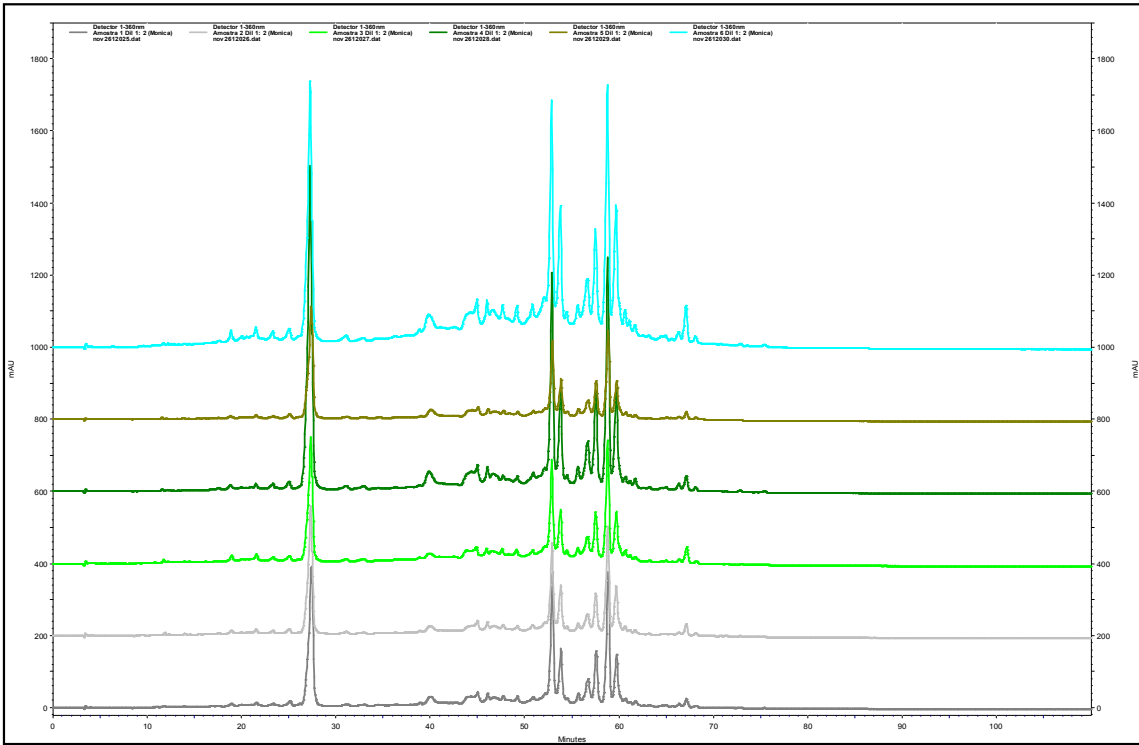
[] ppm	(λ) Abs.
10	0,0258
20	0,0498
40	0,0986
60	0,1399
80	0,1921
100	0,2389
120	0,2872

Reta de calibração da catequina para o teor de procianidinas

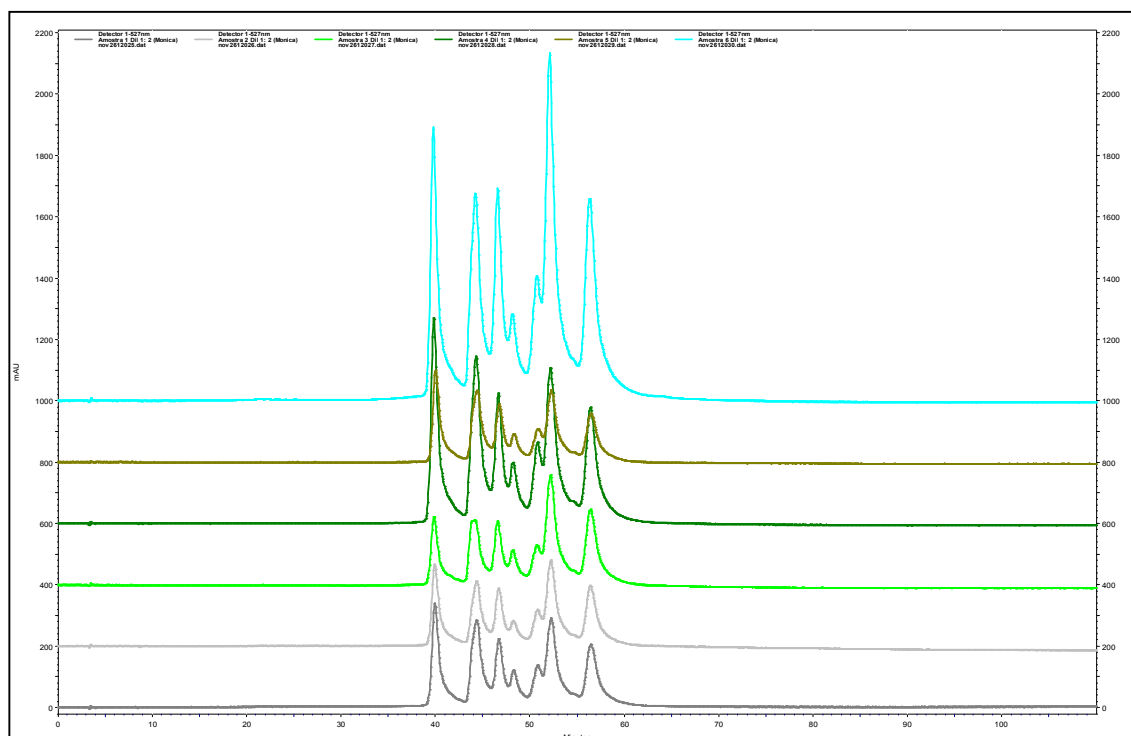


Anexo 6 - Sobreposição dos cromatogramas dos extratos preparados para a otimização das condições de extração

Comparação dos perfis cromatográficos das amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (1:2) aos 360nm



Comparação dos perfis cromatográficos das amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (1:2) aos 527nm



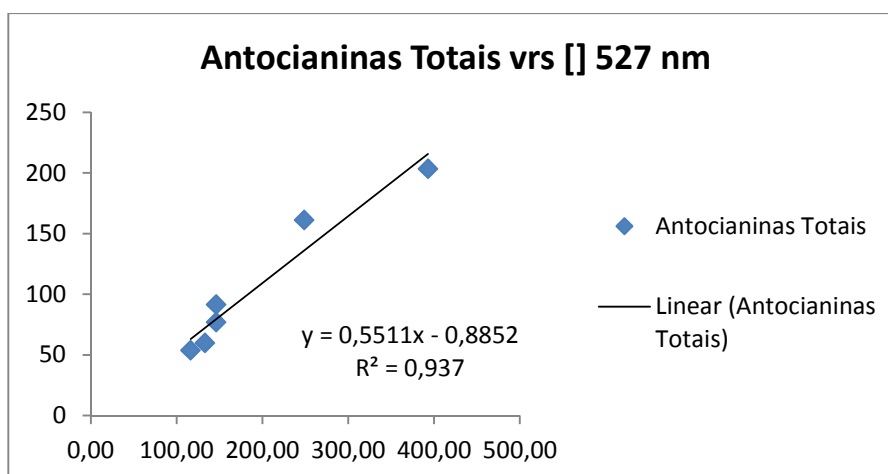
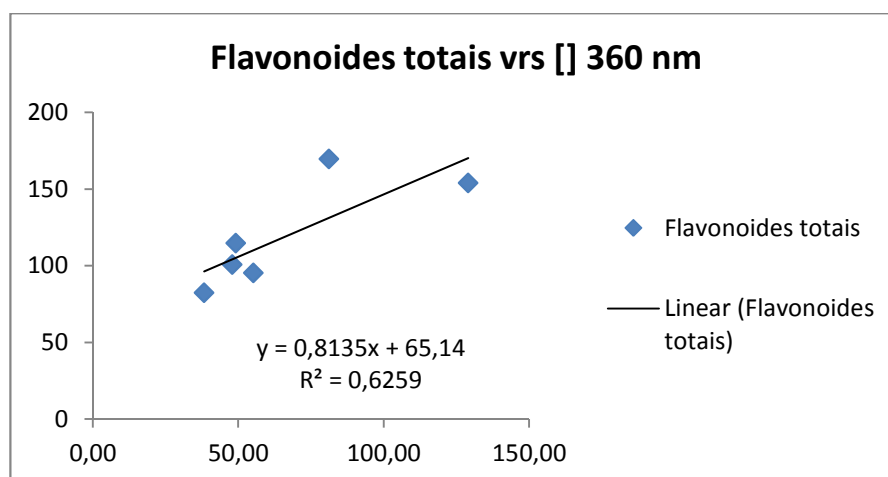
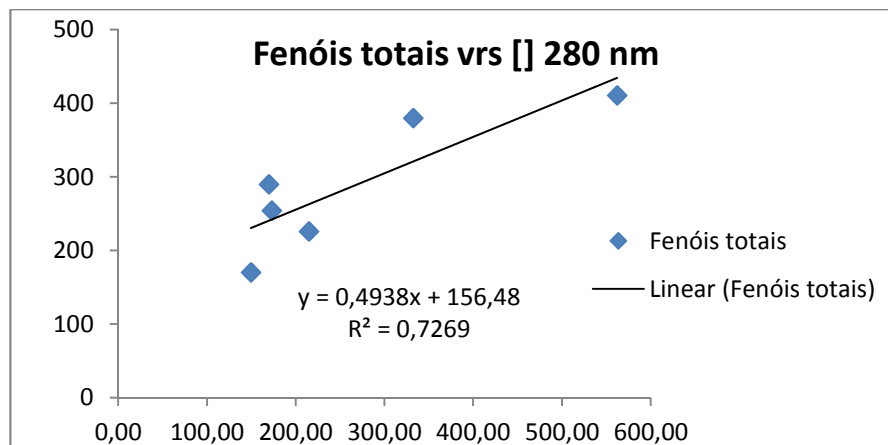
Anexo 7 - Comparação dos teores totais, para as diferentes classes de fenólicos, obtidos por espectrofotometria e por HPLC-DAD a 280, 360 e 527nm

Áreas totais dos cromatogramas a 280, 360 e 527nm dos diferentes extratos, e padrões utilizados para a determinação dos teores totais expressos em mg/100 gramas de fruto

Extrato (1:2)	Área total	C. Onda	Padrão	R^2	\square mg/100g
6	824356001	280 nm	Ácido gálico $Y=292973x+628971$	0.99	562,32
6	261225286	360 nm	Quercetina-3-glucósido $Y=404619x+69245$	0.99	129,09
6	402809141	527 nm	Peonidina-3-glucósido $Y=205318x-600455$	0.99	392,96
5	219749945	280 nm	Ácido gálico $Y=292973x+628971$	0.99	149,58
5	77506161	360 nm	Quercetina-3-glucósido $Y=404619x+69245$	0.99	38,28
5	118696050	527 nm	Peonidina-3-glucósido $Y=205318x-600455$	0.99	116,21
4	487858806	280 nm	Ácido gálico $Y=292973x+628971$	0.99	332,61
4	164177250	360 nm	Quercetina-3-glucósido $Y=404619x+69245$	0.99	81,12
4	254789487	527 nm	Peonidina-3-glucósido $Y=205318x-600455$	0.99	248,78
3	315365744	280 nm	Ácido gálico $Y=292973x+628971$	0.99	214,86
3	111751574	360 nm	Quercetina-3-glucósido $Y=404619x+69245$	0.99	55,20
3	149254768	527 nm	Peonidina-3-glucósido $Y=205318x-600455$	0.99	145,97
2	254142745	280 nm	Ácido gálico $Y=292973x+628971$	0.99	173,06
2	97005962	360 nm	Quercetina-3-glucósido $Y=404619x+69245$	0.99	47,92
2	135972406	527 nm	Peonidina-3-glucósido $Y=205318x-600455$	0.99	133,04

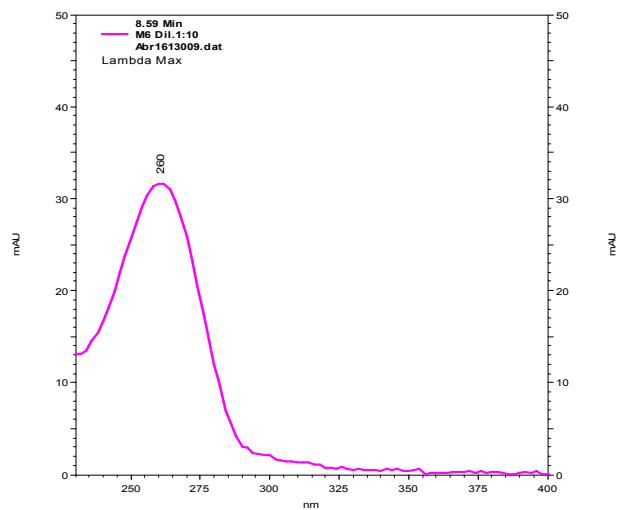
1	249572245	280 nm	Ácido gálico $Y=292973x+628971$	0.99	169,94
1	99505997	360 nm	Quercetina-3-glucósido $Y=404619x+69245$	0.99	49,15
1	149271689	527 nm	Peonidina-3-glucósido $Y=205318x-600455$	0.99	145,99

Correlação entre os teores totais, para as diferentes classes de fenólicos, obtidos por espectrofotometria e por HPLC-DAD

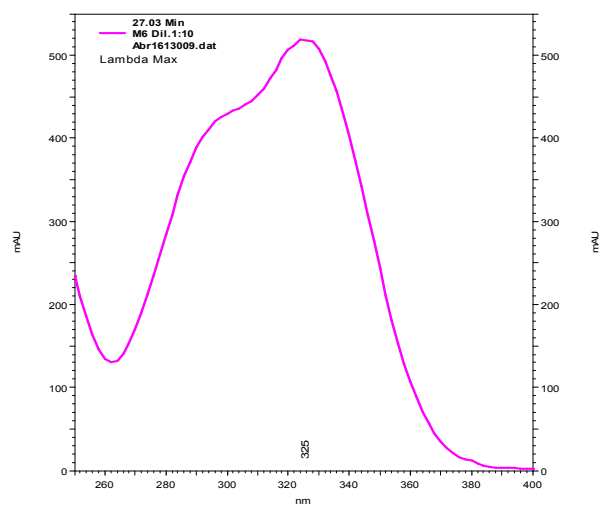


Anexo 8 - Espectros característicos das principais classes de fenólicos presentes no extrato

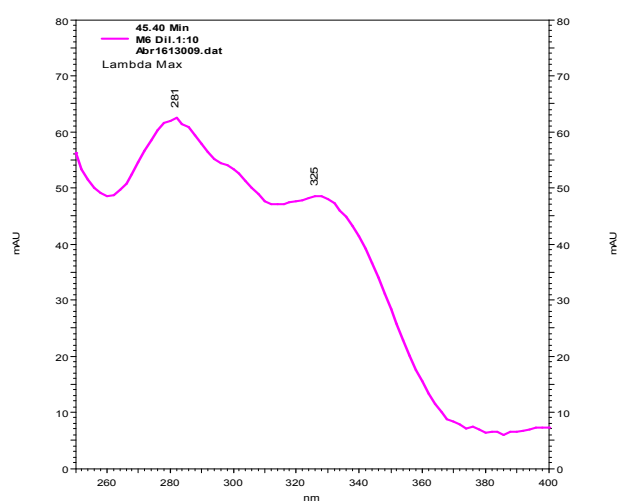
Espetro de absorção característico dos ácidos hidroxibenzoicos (254 nm)



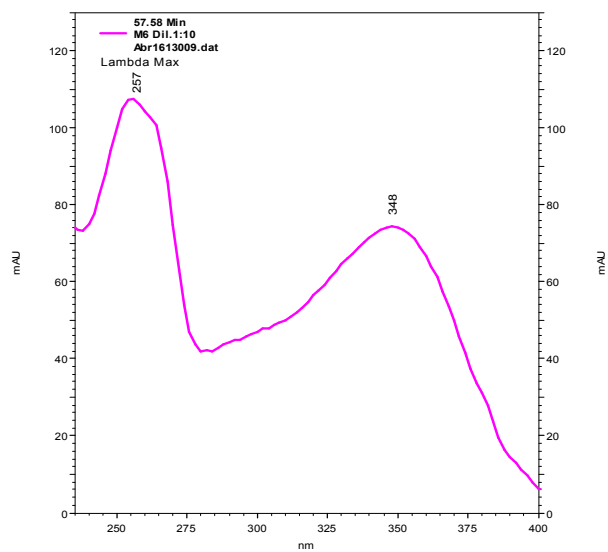
Espetro de absorção característico dos ácidos hidroxicinâmicos (320nm)



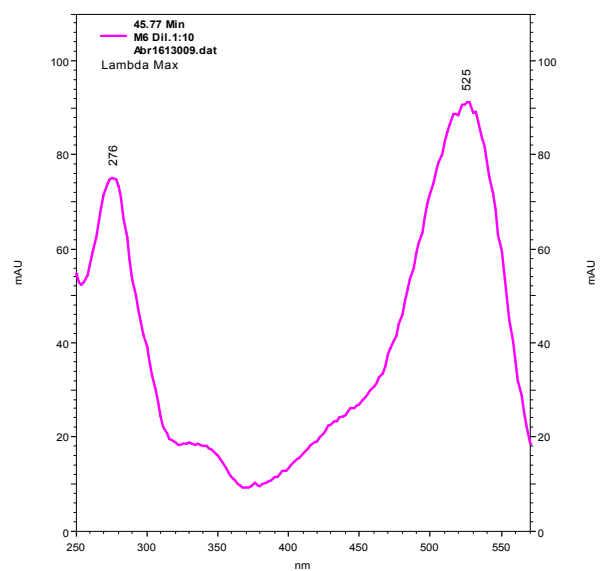
Espetro de absorção característico das catequinas e procianidinas (280nm)



Espetro de absorção característico dos flavonóis (360nm)

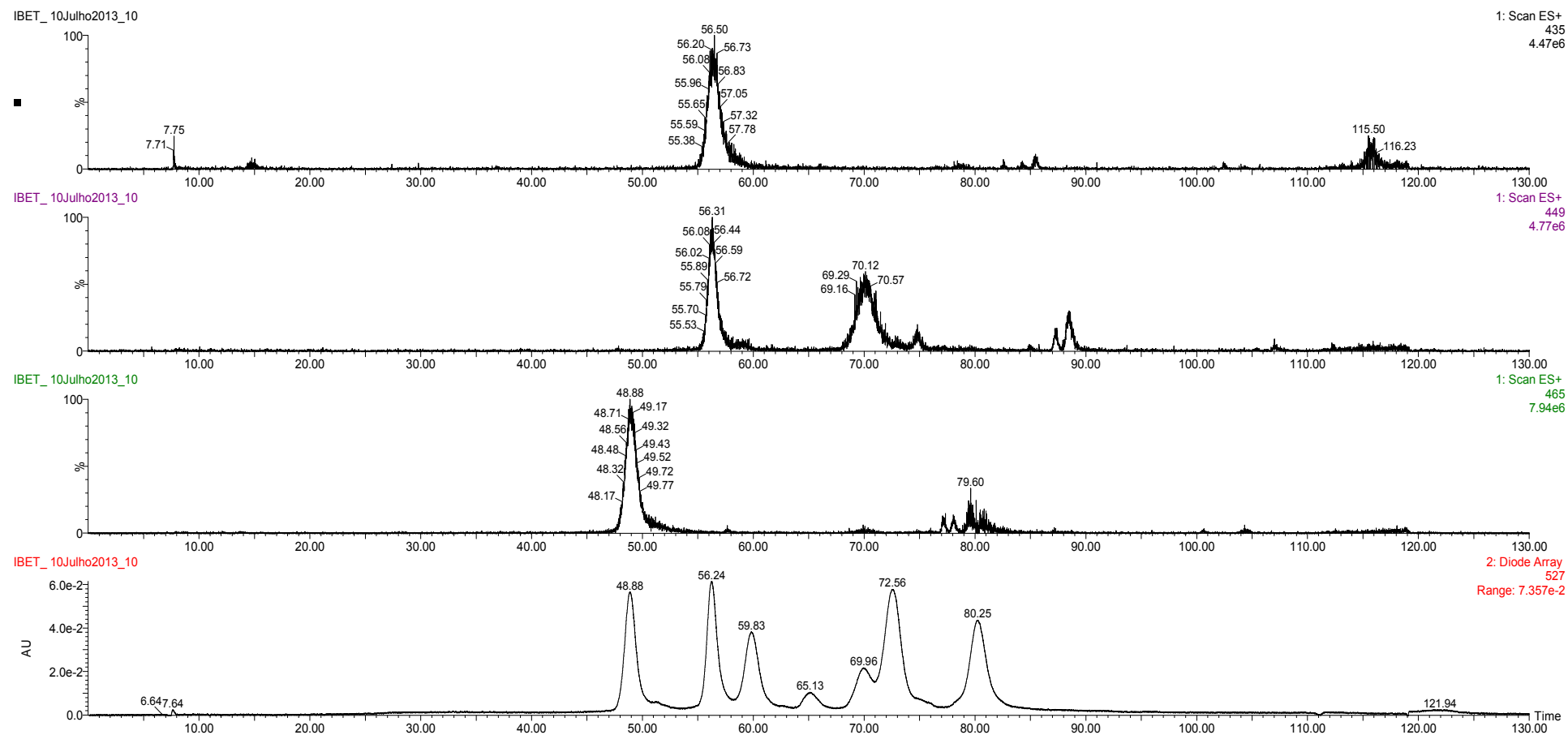


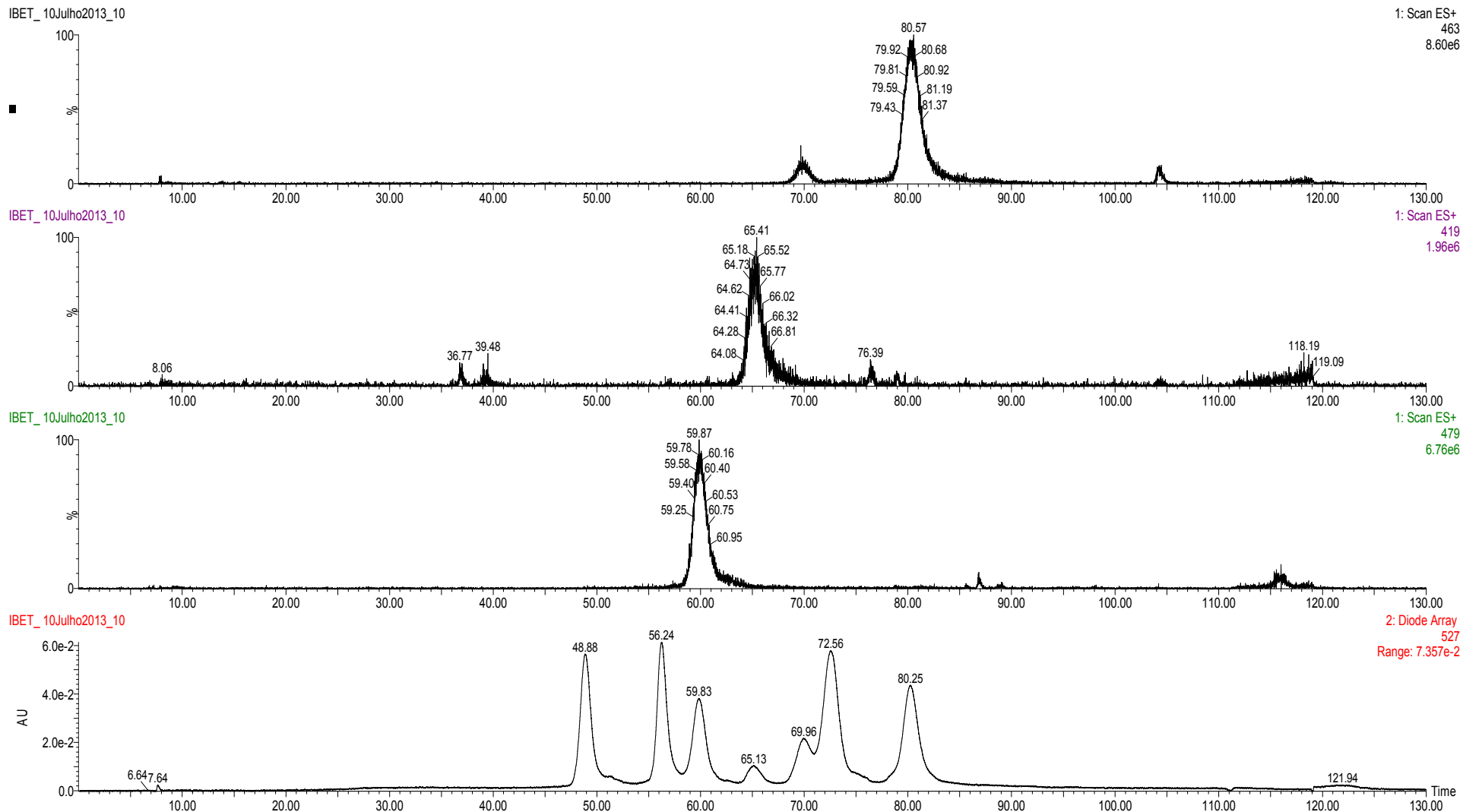
Espetro de absorção característico das antocianinas (527nm)



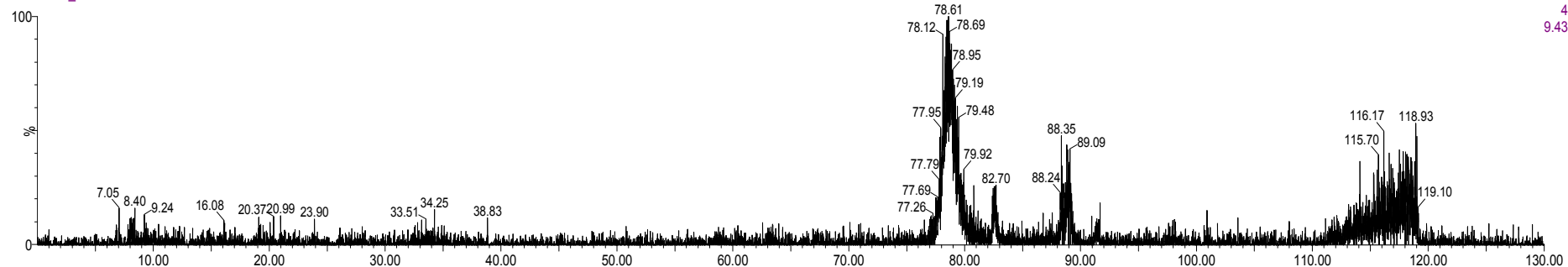
Anexo 9 – Identificação das antocianinas por LC-MS/MS

Cromatogramas do espectro de massa das antocianinas presentes no extrato e cromatograma DAD a 527 nm



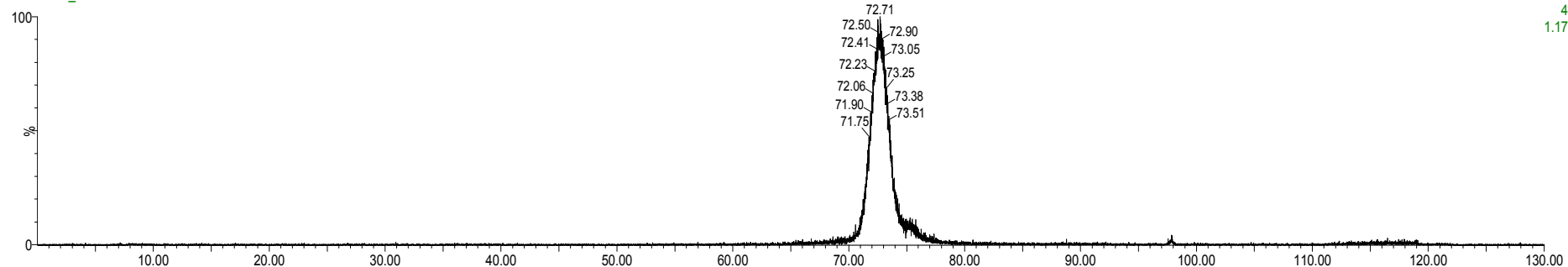


IBET_10Julho2013_10



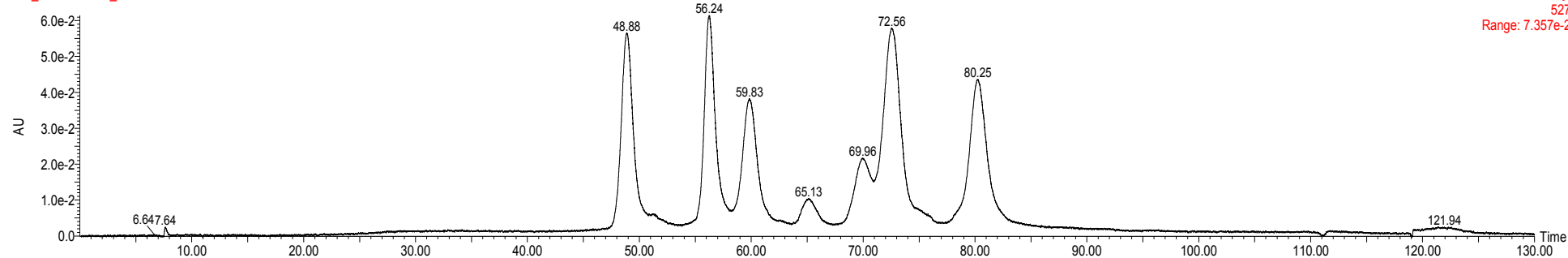
1: Scan ES+
433
9.43e5

IBET_10Julho2013_10



1: Scan ES+
493
1.17e7

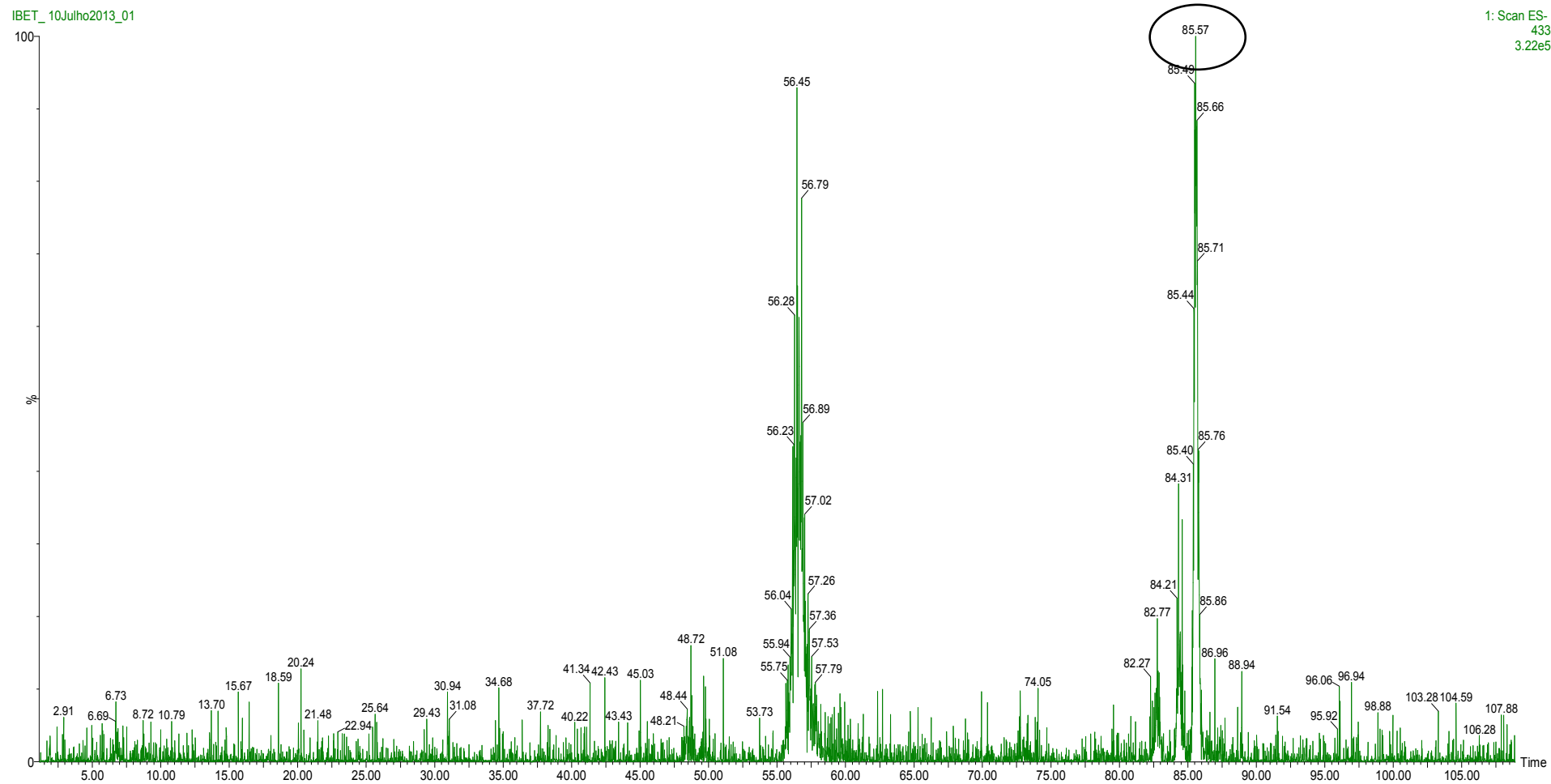
IBET_10Julho2013_10



2: Diode Array
527
Range: 7.357e-2

Anexo 10 – Identificação de flavonóis por LC-MS/MS

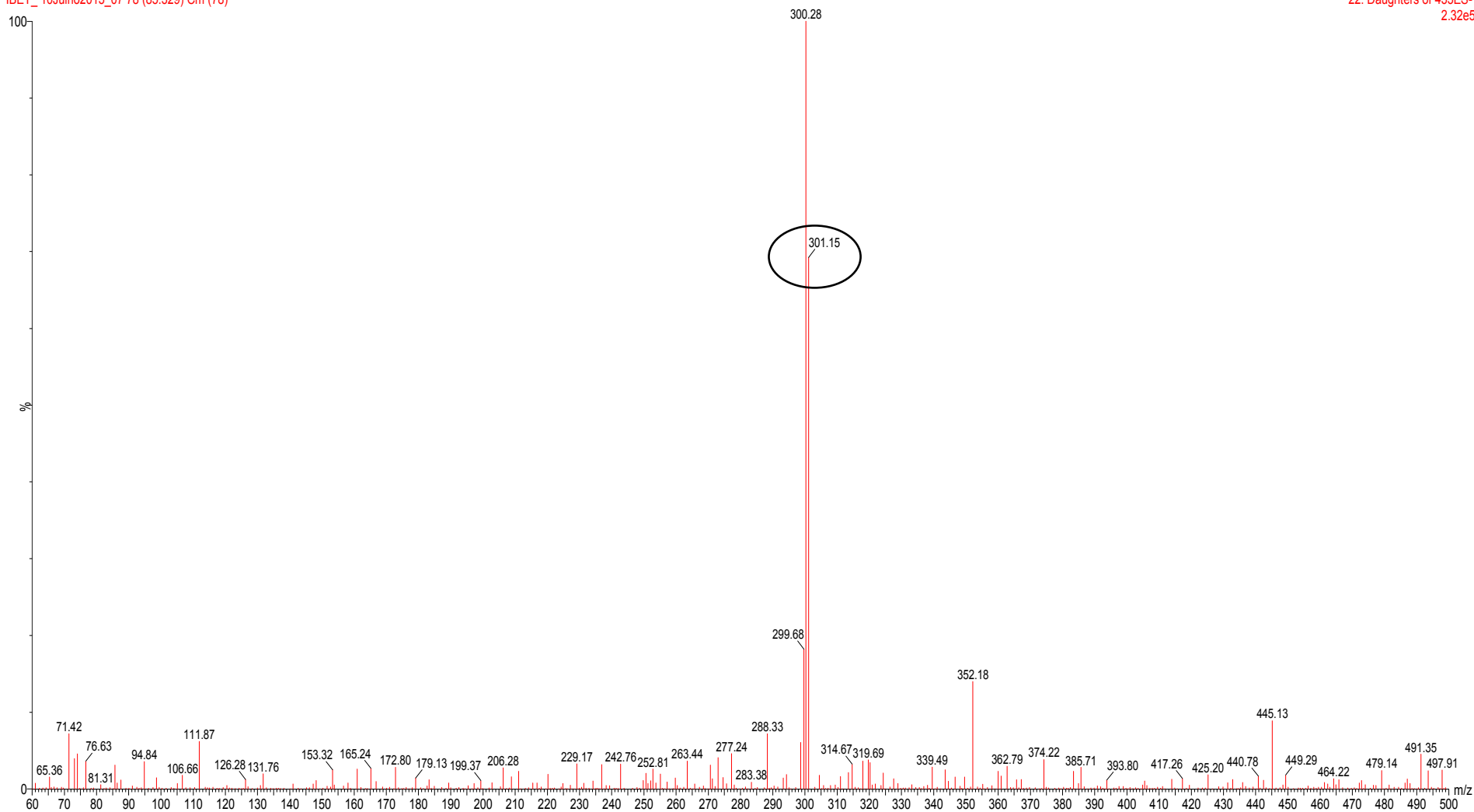
Cromatograma do ião extraído da quercetina-3-xilósido (433 m/z)



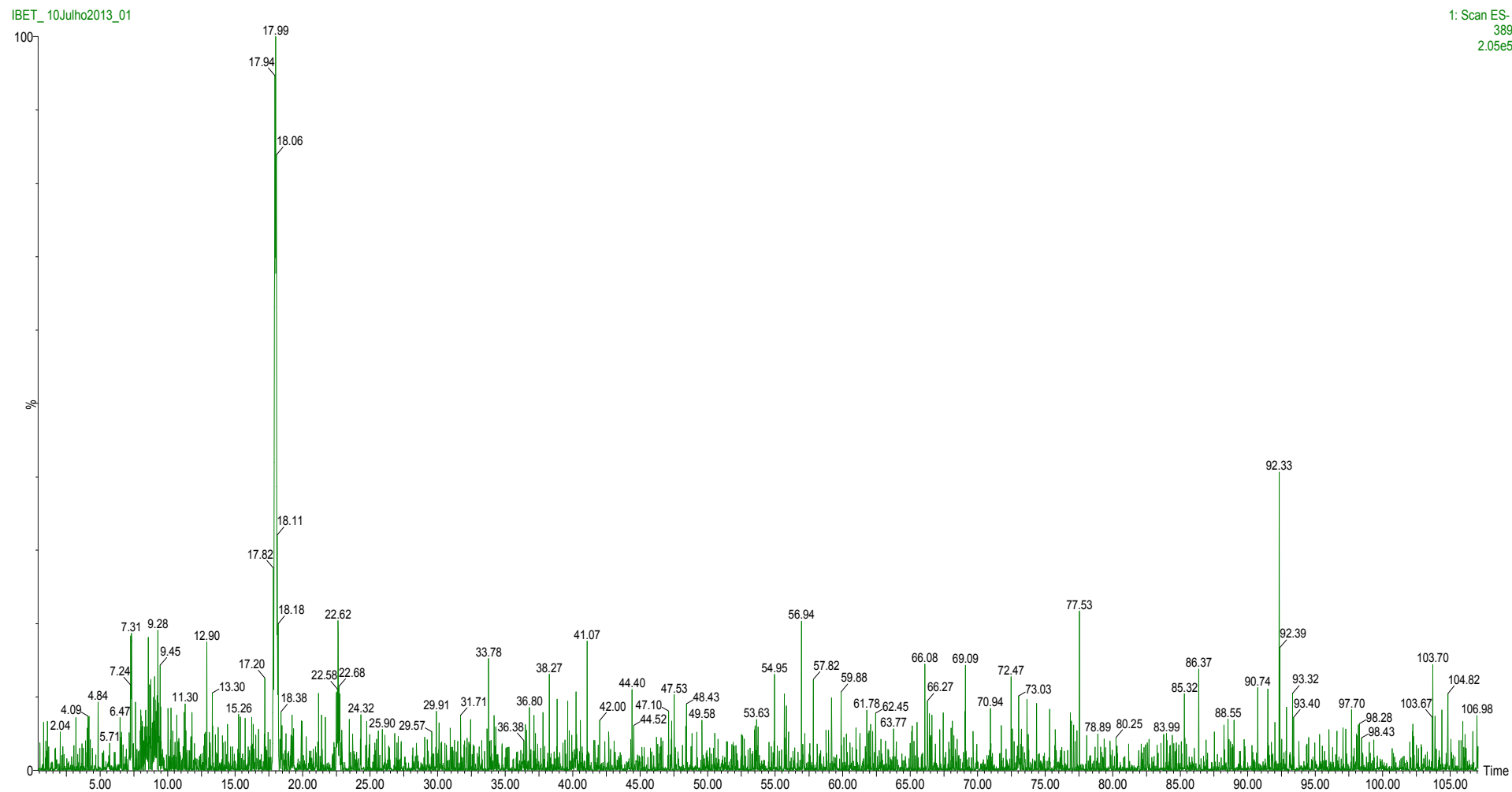
Fragmentação do ião extraído da quercetina-3-xilósido (m/z 301)

IBET_10Julho2013_07 78 (85.329) Cm (78)

22: Daughters of 433ES-
2.32e5



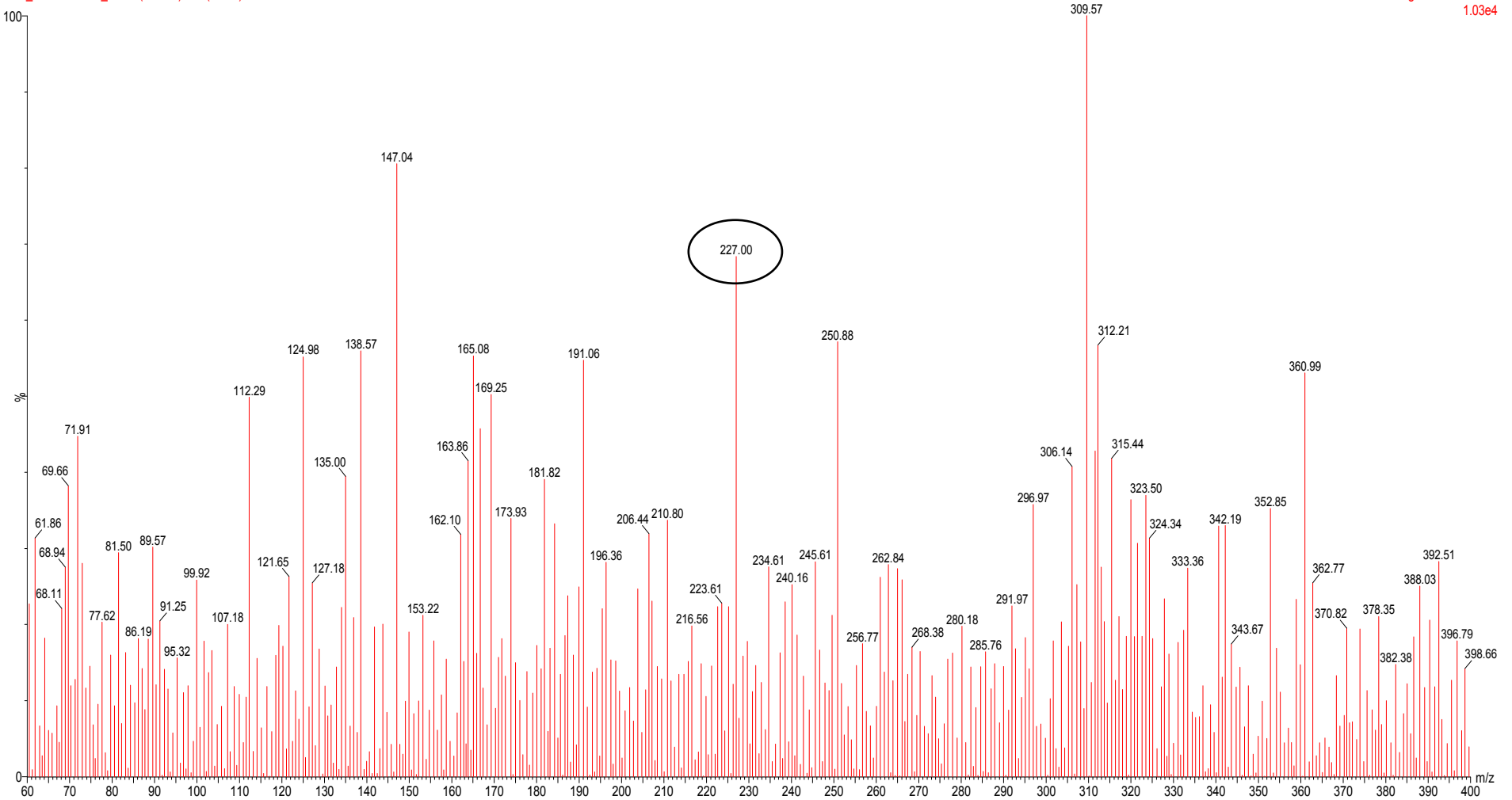
Cromatograma do ião extraído do resveratrol-3-glucósido (389 m/z)



Fragmentação do ião extraído do resveratrol-3-glucósido (m/z 227)

IBET_ 10Julho2013_02 32 (17.052) Cm (30:36)

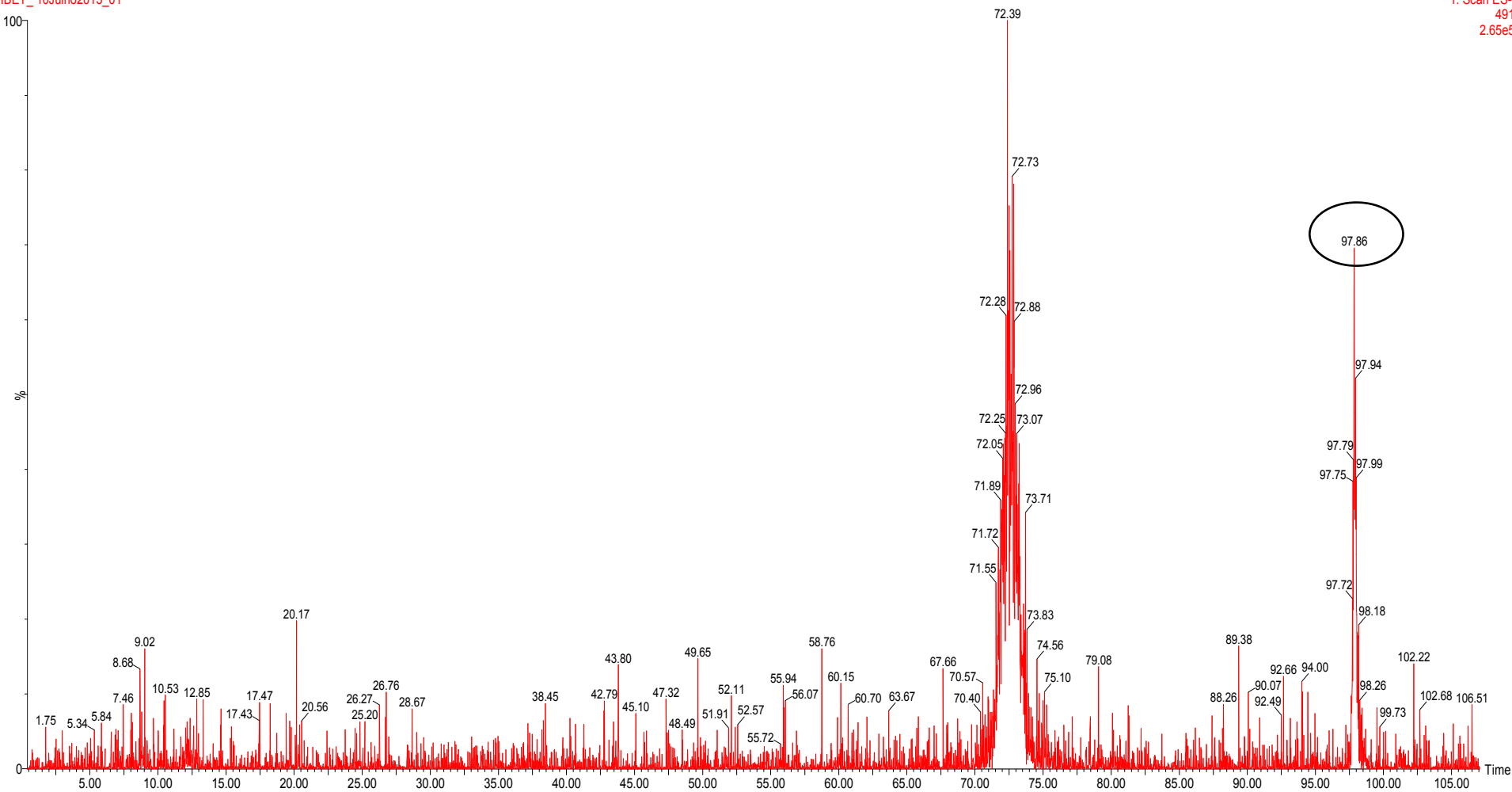
19: Daughters of 389ES-
1.03e4



Cromatograma do ião extraído da isoramnetina-3-glucorónido (491 m/z)

IBET_10Julho2013_01

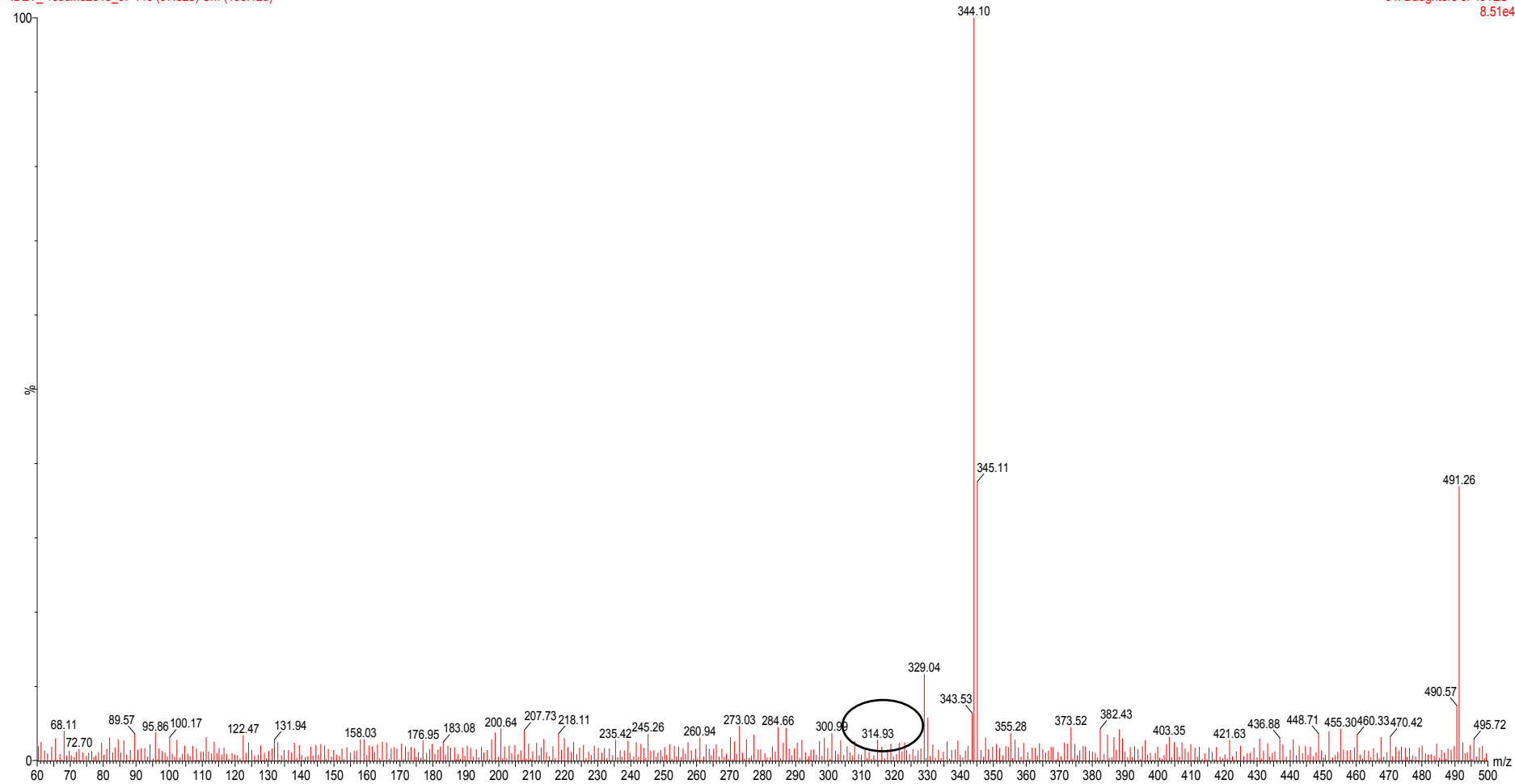
1: Scan ES-
491
2.65e5



Fragmentação do ião extraído da isoramnetina-3-glucorónido (m/z 315)

IBET_10Julho2013_07 110 (97.825) Cm (106:120)

31: Daughters of 491ES-
8.51e4



Anexo 11 - Quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato

Áreas dos picos e respectivas concentrações dos padrões utilizados na obtenção das retas de calibração para quantificação

	Áreas					
Miricetina	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm	
	97656	275786	589644	999467	1232108	
Ácido clorogénico	5 ppm	10 ppm	20 ppm	40 ppm	80 ppm	100 ppm
	863836	1758515	3254714	6783501	13542208	16871781
Ácido ferúlico	0,1 ppm	0,2 ppm	0,4 ppm	0,6 ppm	1 ppm	2 ppm
	89127	156680	304272	514606	895729	1787924
Peonidina-3-glucósido	1 ppm	5 ppm	10 ppm	20 ppm	60 ppm	100 ppm
	104842	559406	1028359	3040549	12050149	19856227
Quercetina-3-glucósido	5 ppm	10 ppm	20 ppm	60 ppm	100 ppm	
	2566575	4062743	7836627	23988691	40792380	
Ácido gálico	1 ppm	5 ppm	10 ppm	20 ppm	40 ppm	80 ppm
	465692	1903196	3284677	7327838	14907418	30429758
Catequina	1 ppm	5 ppm	10 ppm	30 ppm	70 ppm	100 ppm
	72236	310993	693276	1767287	4148748	5938423
Canferol-3-glucósido	1 ppm	5 ppm	10 ppm	30 ppm	50 ppm	
	186926	876290	1895816	5375149	8914628	
Isoramnetina-3-rutinosido	5 ppm	10 ppm	20 ppm	25 ppm	50 ppm	
	982948	1605904	3817450	4956246	9373848	

Áreas dos compostos identificados, o respetivo comprimento de onda máximo, o padrão utilizado para a quantificação, a respetiva reta de calibração, e a concentração do compostos expressa em mg equivalentes de padrão por litro de extrato e por 1 grama de fruta.

Composto	Área	λ máx	Padrão p/ quantificar	Reta p/ quantificar	□ eq. Padrão (mg/L)	□ eq. Padrão (mg/g FF)
Ácido quínico	178387	280 nm	Ácido gálico	$y=381159x-190364$	0,967	0,010
Ácido málico	11585	280 nm	Ácido gálico	$y=381159x-190364$	0,530	0,005
Ácido cítrico Ácido Chiquímico	17804	280 nm	Ácido gálico	$y=381159x-190364$	0,546	0,005
Ácido cafeico-4-glucósido	816063	280 nm	Ácido clorogénico	$y=168875x+1914,7$	4,821	0,048
Procianidinas Dímeros B	808	320 nm	Catequina	$y=58909x+31930$	-0,528	<1ppm
Ácido ferulico-4-glucósido Catequina	982113	320 nm	Catequina	$y=58909x+31930$	16,139	0,161
Ácido cafeico-3-glucósido	799033	320 nm	Ácido clorogénico	$y=168875x+1914,7$	4,720	0,047
Ácido clorogénico	17210391	320 nm	Ácido clorogénico	$y=168875x+1914,7$	101,90	1,019
Ácido cafeico	551737	320 nm	Ácido clorogénico	$y=168875x+1914,7$	3,256	0,033
Ácido ferulico-3-glucósido	174702	320 nm	Ácido ferúlico	$y=922781x-33709$	0,226	0,002
Delfinidina-3-galactósido Delfinidina-3-glucósido	5060457	527 nm	Peonidina-3-glucósido	$y=205318x-600455$	27,57	0.276
Cianidina-3-galactósido	454787	527 nm	Peonidina-3-glucósido	$y=205318x-600455$	5,14	0.051
Cianidina-3-glucósido Delfinidina-3-arabinósido	4202535	527 nm	Peonidina-3-glucósido	$y=205318x-600455$	23,39	0.234
Petunidina-3-galactósido Petunidina-3-glucósido	3476788	527 nm	Peonidina-3-glucósido	$y=205318x-600455$	19,86	0.199
Isoramnetina-3-galactósido Isoramnetina-3-glucósido	225076	320 nm	Isoramnetina-3-glucósido	$y=157652x-233838$	2,91	0,029
Cianidina-3-arabinósido	905100	527 nm	Peonidina-3-glucósido	$y=205318x-600455$	7,33	0.073
Peonidina-3-galactósido Peonidina-3-glucósido Petunidina-3-arabinósido	2302981	527 nm	Peonidina-3-glucósido	$y=205318x-600455$	14.14	0.14
Malvidina-3-galactósido Malvidina-3-glucósido	6387890	527 nm	Peonidina-3-glucósido	$y=205318x-600455$	34,04	0.340
Quercetina-3-rutinósido	333169	360 nm	Quercetina-3-glucósido	$y=404619x+69245$	0,652	0,007

Quercetina-3-galactósido	1235801	360 nm	Quercetina-3-glucósido	$y=404619x+69245$	2,883	0,029
Quercetina-3-glucósido	630578	360 nm	Miricetina	$y=327879x-373325$	3,062	0,031
Miricetina-3-galactósido						
Miricetina-3-glucósido						
Canferol-3-glucorónido	63304	280 nm	Canferol-3-glucósido	$y=177879x+34479$	0,162	0,002
Peonidina-3-arabinósido	4460601	527 nm	Peonidina-3-glucósido	$y=205318x-600455$	24.65	0.247
Malvidina-3-arabinósido						
Canferol-3-rutinósido	201187	360 nm	Canferol-3-glucósido	$y=177879x+34479$	0,937	0,009
Quercetina-3-xilósido						
Isoramnetina-3-rutinósido	1208175	360 nm	Canferol-3-glucósido	$y=177879x+34479$	6,598	0,066
Quercetina-3-ramnósido						
Canferol-3-galactósido						
Canferol-3-glucósido						
Laricitrina-3-O-galactósido						
Laricitrina-3-O-glucósido						
Miricitina-3-O-pentósido						
Laricitrina-3-ramnósido	643991	360 nm	Canferol-3-glucósido	$y=177879x+34479$	3,427	0,034
Quercetina(acetil)galactósido						
Quercetina(acetil)glucósido						
Quercetina-3-glucorónido						
Siringetina-3-O-galactósido						
Siringetina-3-O-glucósido						
Siringetina-3-O-ramnósido	202541	360 nm	Isoramnetina-3-rutinósido	$y=189551x+731,85$	1,065	0,011
Isoramnetina-3-glucorónido						

Cálculos do fator de correção do peso molecular (FCPM) para os ácidos fenólicos e flavonóides

Composto	Massa analito	Massa padrão	FCPM
Ácido quínico	191	169	1.13
Ácido málico	133	169	0.79
Ácido cítrico	191	169	1.13
Ácido Chiquímico			
Ácido cafeico-4-glucósido	341	353	0.966
Procianidinas Dímeros B	577	289	1.997
Ácido cafeico-3-glucósido	341	353	0.966
Ácido cafeico	179	353	0.507
Ácido ferulico-3-glucósido	355	193	1.839
Quercetina-3-rutinósido	609	463	1.315
Quercetina-3-glucósido			
Miricetina-3-galactósido	479	317	1.511
Miricetina-3-glucósido			
Canferol-3-glucorónido	461	447	1.03
Canferol-3-rutinósido			
Quercetina-3-xilósido	433	447	0.969
Laricitrina-3-ramnósido			
Quercetina(acetil)galactósido			
Quercetina(acetil)glucósido			
Quercetina-3-glucorónido	477	447	1.067
Siringetina-3-O-galactósido			
Siringetina-3-O-glucósido			
Siringetina-3-O-ramnósido			
Isoramnetina-3-glucorónido	491	623	0.788

Anexo 12 - Correlação entre os teores das diferentes técnicas espectrofotométricas e a atividade antioxidante (ORAC e HORAC)

